

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Vliv inkubačních roztoků na *in vitro* stravitelnost
travní siláže

Diplomová práce

Autor: Bc. Kateřina Stárková

Vedoucí: doc. Ing. Alois Kodeš, CSc.

Konzultant: Ing. Jitka Láchová

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv inkubačních roztoků na *in vitro* stravitelnost travní siláže" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2017_____

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Aloisi Kodešovi, CSc. za vstřícný přístup a cenné rady při řešení mé diplomové práce. Dále děkuji svojí konzultantce, Ing. Jitce Láchové, za projevenou ochotu, doporučení potřebné literatury a odborné vedení mé diplomové práce, za pomoc při odběru vzorků a jejich následném zpracování, včetně provedení analýz. Velké poděkování zároveň patří doc. Ing. Josefu Haklovi, Ph.D., který byl velmi nápomocen při řešení statistické problematiky.

Vliv inkubačních roztoků na *in vitro* stravitelnost travní siláže

Souhrn

Předmětem zkoumání byly travní siláže, které jsou pro koně objemným krmivem s vysokým obsahem vlákniny. Vlákna obsahuje stravitelnou a nestravitelnou složku. Podíl nestravitelné složky, především ligninu, je limitujícím faktorem stravitelnosti píce. U pěti travních siláží byly odebrány vzorky a stanoveno jejich živinové složení (sušinu, popeloviny, organickou hmotu, NL, tuky, CF, NDF, ADF). U stejných vzorků byla za pomoci ANKOM Daisy^{II} Inkubátoru stanovena stravitelnost sušiny a OM. Cílem experimentu bylo stanovení stravitelnosti na tomto přístroji za použití různých inkubačních roztoků, vyhodnotit jejich vliv na výsledky *in vitro* stanovení stravitelnosti a vliv na přesnost *in vitro* stanovení stravitelnosti. Využit byl pepsin-celulázový inkubační roztok a inkubační roztok vytvořený z čerstvě odebraných koňských faeces. Počet stanovovaných vzorků byl $n=15$. Na základě zjištěných hodnot byl statisticky, pomocí párového *t*-Testu, regresní a korelační analýzy vyhodnocen vztah mezi stravitelností OM a použitým inkubačním roztokem. Stejný vztah byl vyhodnocen i pro stravitelnost sušiny.

Na základě výsledků a jejich porovnání bylo zjištěno, že jednotlivé inkubační roztoky poskytují rozdílné hodnoty stravitelnosti, variabilita získaných výsledků je poměrně vysoká především při použití faeces jako inkubačního roztoku. Použití pepsin-celulázového inkubačního roztoku poskytuje výsledky s vyššími hodnotami stravitelnosti. Zatímco použití inkubačního roztoku z koňských faeces poskytuje hodnoty stravitelnosti nižší. Hodnoty stanovené za použití pepsin-celulázového inkubačního roztoku pro stravitelnost organické hmoty byly oproti roztoku z faeces v průměru vyšší o 15,1 % a hodnoty stravitelnosti sušiny v průměru vyšší o 17,8 %.

Klíčová slova: zemědělství, živočišná výroba, výživa koní, travní siláž, živinové složení, stravitelnost, inkubační roztok

Effect of incubation solution on *in vitro* digestibility of grass silage

Summary

The subject of this thesis was researching of grass silage, which is bulky feed for horses with high fiber content. The fiber contains digestible and indigestible components. The portion of indigestible components, mainly lignin, is a limiting factor of digestibility of forage. The samples were taken from five grass silage and their nutrient composition (dry matter, ash, organic matter, nitrogen compounds, fats, CF, ADF, NDF) was determined. The digestibility of dry matter and OM was determined at the same samples using the AnkomDaisyII Incubator. The aim of the experiment was to determine the digestibility of this unit using different incubation solutions, to evaluate their influence on the results of *in vitro* determination of the digestibility and their effect on the accuracy of the determination of the *in vitro* digestibility. The pepsin – cellulase incubation solution and incubation solution made from freshly harvested horse faeces were used. The number of analyzed samples was n=15. On the basis of the determined values the relationship between digestibility OM and the applied incubation solution was evaluated statistically by paired t-test, regression and correlation analysis. The same relationship was evaluated for the digestibility of dry matter.

Based on the results and their comparison it was found that individual incubation solutions provide different values of digestibility. The variability of achieved results is quite high especially when using faeces as incubation solution. The results with higher values of digestibility are provided by using of a cellulase – pepsin incubation solution. While the use of the incubation solution from equine faeces presents values of lower digestibility. The values determined by the use of cellulase – pepsin incubation solution for digestibility of organic matter were 15,1 % higher on average than the results from the faeces solution. And the values of the digestibility of dry matter 17,8 % were higher on average.

Keywords: agriculture, livestock production, horses nutrition, grass silage, nutrient composition, digestibility, incubation solution

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíl práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Anatomie a fyziologie trávicího traktu koně	3
3.1.1 Dutina ústní.....	4
3.1.2 Jícen	4
3.1.3 Žaludek.....	4
3.1.4 Tenké střevo.....	6
3.1.5 Tlusté střevo.....	6
3.1.6 Přídatné orgány.....	8
3.2 Chemické složení krmiva	8
3.2.1 Sacharidy.....	8
3.2.1.1 Monosacharidy.....	9
3.2.1.2 Polysacharidy.....	9
3.2.1.3 Škroby.....	10
3.2.2 Sacharidový komplex	10
3.2.2.1 Vlákna	11
3.2.2.2 Celulóza	12
3.2.2.3 Hemicelulóza	12
3.2.2.4 Lignin	12
3.2.3 Tuky.....	13
3.2.4 Bílkoviny.....	13
3.3 Objemná krmiva.....	15
3.3.1 Travní porosty	16
3.3.2 Produkce objemných krmiv	17
3.3.3 Produkce travní siláže	18
3.3.4 Mikrobiologie travní siláže	19
3.3.5 Krmení travní siláže koním.....	21
3.4 Stravitelnost krmiva	22
3.5 Metody stanovení stravitelnosti.....	23
3.5.1 Stanovení stravitelnosti <i>In vivo</i>	24
3.5.1.1 Bilanční stravitelnost	24
3.5.1.2 Indikátorová metoda.....	25
3.5.1.3 Stravitelnost in sacco.....	25
3.5.2 Stanovení stravitelnosti <i>In vitro</i>	25

3.5.2.1 Dvoustupňová analýza „Two stage“	25
3.5.2.2 Stanovení stravitelnosti za použití přístroje ANKOM Daisy ^{II} Inkubátor	26
3.5.2.3 <i>In vitro</i> pepsin-celulázová rozpustnost	26
4 Materiál a metody	28
4.1 Příprava vzorků k analýze	28
4.1.1 Úprava vzorků předsoušením	28
1.1.2 Úprava vzorků mletím	29
4.3 Stanovení živin vzorků travních siláží	29
1.1.1 Stanovení sušiny a popelovin	29
4.3.2 Stanovení obsahu tuku	31
4.3.3 Stanovení dusíkatých látek Kjeldahlovou metodou	31
4.3.4 Stanovení acidodetergentní vlákniny (ADF) a neutrálně detergentní vlákniny (NDF)	33
4.4 Stanovení <i>in vitro</i> stravitelnosti krmiv pomocí přístroje Daisy^{II} Incubator	35
4.4.1 Příprava vzorků	35
4.4.2 Stanovení <i>in vitro</i> stravitelnosti pomocí koňských faeces	36
4.4.3 Stanovení <i>in vitro</i> stravitelnosti pomocí pepsin-celulázové rozpustnosti	37
4.5 Výpočet stravitelnosti	39
4.5.2 Stravitelnost sušiny	39
4.5.3 Stravitelnost organické hmoty	39
5 Výsledky	40
5.1 Živinové složení travní siláže	40
5.2 <i>In vitro</i> stravitelnost travních siláží	42
5.2.1 H1 Inkubační roztoky neovlivňují získané hodnoty <i>in vitro</i> stanovení stravitelnosti vybraných živin v travní siláži	44
5.2.2 H2 mezi inkubačními roztoky neexistuje korelace ve výsledcích stanovení <i>in vitro</i> stravitelnosti živin	45
6 Diskuse	48
Závěr	52
Seznam literatury	53
Seznam použitých zkratk a symbolů	61
Přílohy	62

1 Úvod

Býložraví koně byli odjakživa uzpůsobeni pastevnímu způsobu života. Dnešní domestikovaní koně bývají krmeni různorodou stravou zahrnující klasickou píci s vysokým podílem vlhkosti, senem s vysokým podílem sušiny, či jádrem s velkým podílem škrobu. Důležitost výzkumu výživy koní spočívá ve snaze poskytnout jim kvalitní krmivo, které by kompenzovalo stále se zvyšující fyzické nároky, které jsou na ně kladeny a zohledňovalo způsob chovu, který je velmi odlišný od původního způsobu života koní. Dnes již také nebývá samozřejmostí dostupnost kvalitní pastvy, která by s chovem koní měla být automaticky spjata. S ohledem na tyto změny je nutné zamýšlet se nad možnostmi produkce kvalitního konzervovaného krmiva. Produkce travní siláže nemá v našich středoevropských podmínkách dlouhou tradici. Konzervace silážováním je využívána především v severských zemích, kde klimatické podmínky nedovolují výrobu dostatečně kvalitního objemného krmiva sušením. Dle mnohých autorů, zabývajících se touto problematikou, lze procesem silážování získat krmivo, které oproti senu poskytuje koním více energie a má vyšší stravitelnost. Na základě těchto poznatků by bylo vhodné zamyslet se nad možností náhrady přísunu energie z koncentrovaných (jadrných) krmiv zdroji energie z travních siláží.

V diplomové práci je predikována degradovatelnost a stravitelnost organické hmoty a sušiny travní siláže *in vitro* metodou využívající přístroje ANKOM Daisy^{II} Incubator. Stravitelnost organické hmoty a sušiny je jedním z nejdůležitějších ukazatelů hodnoty krmiva. Existuje několik možností, kterými lze stravitelnost posuzovat – například *in vivo* bilančními pokusy, nebo *in sacco* inkubací přímo v trávicím traktu zvířete. *In vitro* stanovení stravitelnosti oproti ostatním metodikám vyžaduje pracné provedení veškerých analýz v laboratorních podmínkách. Jeho výhodou jsou nižší časové i finanční náklady, a především není nutné přímé účasti zvířete v experimentu, ani provedení invazivních zákroků na něm. V současné době je prováděno mnoho experimentů zkoumajících využití různých inkubačních roztoků, které by umožnily co nejpřesnější stanovení stravitelnosti *in vitro*. V diplomové práci je použito pepsin-celulázového inkubačního roztoku, který obsahuje čisté celulolytické a proteolytické enzymy. Druhý inkubační roztok byl vytvořen za použití čerstvých koňských faeces. Koňské faeces vykazují značnou fermentační aktivitu – poskytují dostatečné množství mikroorganismů.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Cíl práce:

Zjistit a porovnat variabilitu výsledků stanovení *in vitro* stravitelnosti vybraných živin travní siláže s využitím různých inkubačních roztoků.

Hypotézy:

H1 – inkubační roztoky neovlivňují získané hodnoty *in vitro* stanovení stravitelnosti vybraných živin v travní siláži

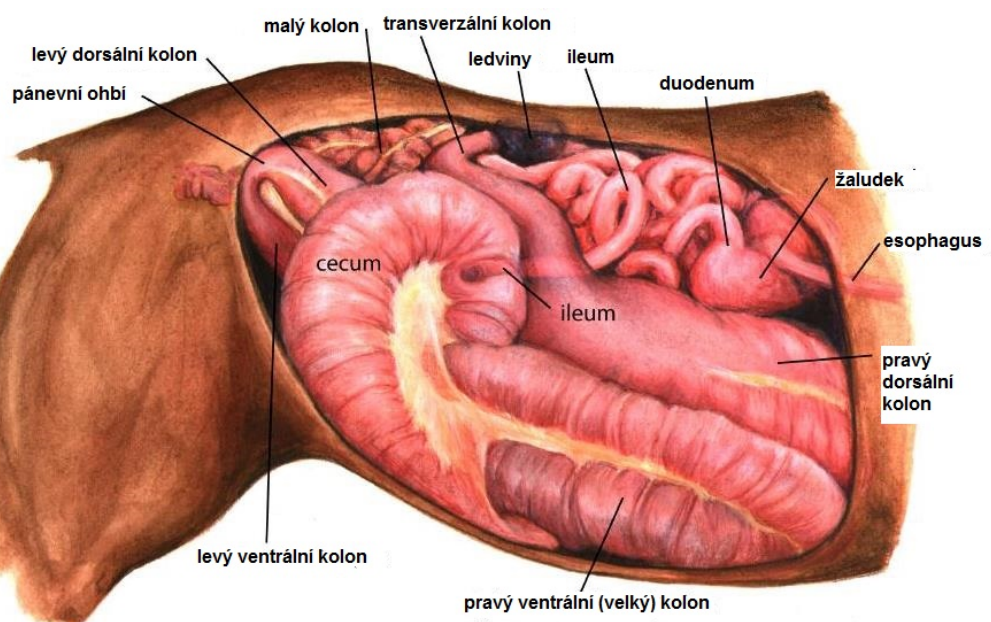
H2 – mezi inkubačními roztoky neexistuje korelace ve výsledcích stanovení *in vitro* stravitelnosti živin

3 Literární rešerše

3.1 Anatomie a fyziologie trávicího traktu koně

Za základ trávicí soustavy je považována dutina ústní, zuby, jazyk, hltan, jícn, žaludek, tenké střevo a tlusté střevo [Obr.1] (Reece, 2011). Stěna trávicí trubice (počínající jícnem) je složena ze sliznice a svaloviny, která je na povrchu kryta řídkým vazivem. Sliznice se ukládá na vazivovém podkladu a v místech, kde je mechanicky namáhána se vyvíjí mnohvrstevný epitel. Na ostatních místech je přítomen jednovrstevnatý epitel vysokých buněk. Sliznici ke svalové vrstvě pojí podslizniční řídké vazivo, které je zvláště ztluštělé v místech jeho silného napínání vlivem zvyšujícího se obsahu části traktu. V klidovém stavu naopak stahuje sliznici do zásobních řas. Základem stěny trávicí trubice je bledě růžová hladká svalová tkáň tvořena smršťujícími se myofibrilami. Tato svalovina se smršťuje velmi pomalu, ve stahu vytrvává dlouhou dobu, neunaví se a je řízena autonomními nervy (Najbrt a kol., 1980). Ve sliznici trávicí trubice se nacházejí drobné žlázy (intramurální), které vyměšují hlen (ochrana povrchu sliznice), nebo sekret (ředění potravy a chemické štěpení). V některých místech trávicí trubice jsou žlázy odděleny do velkých samostatných útvarů a spojeny s trubicí vývodem – extramurální žlázy (Najbrt a kol., 1980).

Obrázek 1 Trávicí trakt koně



zdroj: <http://threeoaksequine.com/wp-content/uploads/2016/03/DG-Pic-1.jpg>

3.1.1 Dutina ústní

V ústní dutině dochází k promíchání přijaté potravy se slinami a začíná zde mechanické trávení. Potrava je mechanicky rozměňována na zubních ploškách, čímž u koně dochází k opotřebení chrupu (Reece a kol., 2011). Hlavní slinnou žlázou u koně je párová příušní, podčelistní a podjazyková slinná žláza (Auer and Stick, 2006). Tyto produkují serózní (vodnatý a čirý), mucinózní (viskózní a hlenovitý, ochraňující sliznici), nebo v případě smíšených slinných žláz oba sekrety (Reece a kol., 2011).

3.1.2 Jícen

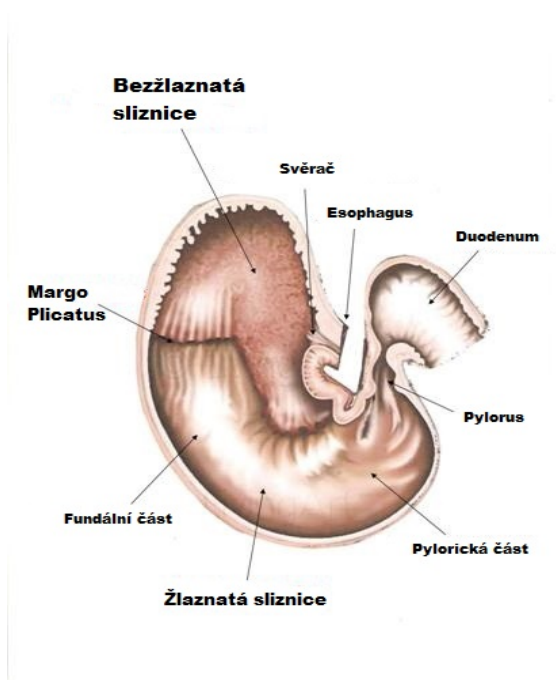
Jícen je svalová trubice spojující hltan a žaludek, leží zleva podél průdušnice a jeho svalovinu tvoří kruhově i podélně uspořádaná svalová vlákna (Reece a kol., 2011). Délka jícnu dosahuje u koně délky 125 až 200 cm v závislosti na plemeni (Auer and Stick, 2006). Potrava je jím transportována pomocí peristaltických vln. Dutina jícnu je v klidovém stavu uzavřená a sliznice uvnitř utváří řasy, které se vyrovnají pouze při průchodu potravy (Reece, 2011).

3.1.3 Žaludek

Žaludek koně je vzhledem k velikosti těla po měrně malý (5-15 l) a ostře zakřiven (Auer and Stick, 2006). Shromažďuje se zde a přechodně zadržuje přijatá potrava. Potrava do žaludku vstupuje pod ostrým úhlem přes česlo, na které navazuje dno žaludku (vytváří slepý vak) a to přiléhá k tělu žaludku. Dohromady tyto části tvoří střední část žaludku, která se při naplnění nejvíce zvětšuje. Následuje vrátníková předsíň, na kterou navazuje vrátník ústící do dvanáctníku (Reece a kol., 2011).

Sliznice glandulární (žláznaté) části žaludku je tvořena několika typy žlázek, které obsahují vedlejší buňky produkující hlen chránící sliznici, hlavní buňky produkující pepsinogen a buňky krycí vylučují HCl, nebo její stavební součásti (Reece a kol., 2011). Přítomnými žlázkami je také vylučován bikarbonát (Bezděková a Jahn, 2003). Přítomné pylorické žlásky vylučují hormon gastrin (Reece a kol., 2011). Přibližně polovina plochy koňského žaludku je tvořena zrohovatěným epitelem, který nemá žádnou sekreční schopnost (tzv. bez žláznatá část). Funkce tohoto epitelu je prozatím neznáma, avšak pravděpodobně chrání spodnější vrstvy před oděrem vlákninou obsaženou v potravě. Přijatá potrava zaplňuje pouze spodní část žaludku, po linii zvanou margo plicatus [Obr. 2] (Auer and Stick, 2006).

Obrázek 2 Průřez žaludkem koně



zdroj: <http://equinedegreeonline.com//>

Margo plicatus je anatomická struktura, která ostře odděluje tyto dva druhy sliznic a představuje hlavní predispoziční místo výskytu gastrických vředů u koně (Bezděková a Jahn, 2003). Během trávení je žaludek schopen díky snížení pH jeho obsahu za pomoci HCl a pepsinogenu zahájit rozklad bílkovin (Auer and Stick, 2006). Pepsinogen je společně s HCl secernován do dutiny žaludku, kde dochází k jeho přeměně na aktivní pepsin, proteolytický enzym. Optimální pH pro aktivitu pepsinu je 1,8-3,5 (Reece a kol., 2011).

Produkce trávicích šťáv u koně je závislá na cirkadiálním rytmu a příjmu potravy. U hříbat dochází k sekreci šťáv do dvou dnů od narození. U dospělých koní je produkce trávicích šťáv asi 1,5 litru za hodinu. Acidita žaludku se pohybuje mezi 1,5 až 7,0. Nejnížší hodnoty pH jsou v oblasti glandulární sliznice (1,5-4,0), středních hodnot (3,0-6,0) dosahuje v oblasti Margo Plicatus a nejvyšších v oblasti slepého vaku (7,0). Pasáž tekutého obsahu žaludkem trvá asi 30 minut, u pevné složky je to maximálně 24 hodin (Bezděková a Jahn, 2003).

3.1.4 Tenké střevo

Začíná dvanáctníkem, ke kterému přiléhá pankreas a ústí do něj jeho vývody pro pankreatickou šťávu, která má významný podíl na trávení. Promíchávání a posun potravy je umožněn pomocí stahů hladké svaloviny. Tenké střevo tvoří 75 % délky střeva koně a probíhají v něm hlavní trávicí procesy (Reece a kol., 2011). Z tekuté zažitiny, přicházející ze žaludku se zde za pomoci enzymů vylučovanými slinivkou tráví sacharidy, bílkoviny a tuk. Dále se v tenkém střevě vstřebávají vitamíny rozpustné v tucích (A, E, D a K), vápník a fosfor (Bentz, 2014). Sliznice tenkého střeva je zřasená a tvořena klky, na jejichž povrchu se nacházejí další mikrokilky epitelových buněk, které vytvářejí kartáčový lem a výrazně zvětšují vnitřní povrch až 600krát. Z epitelových buněk musí vstřebávající se látky do krve projít přes jejich membránu, bazální membránu, intersticiální tekutinu a membránu kapiláry. Lymfou jsou transportovány velké molekuly, které nejsou schopny se vstřebat do krevních kapilár. Do chylového kanálku se dostávají skrz otvor na vrcholu klku. Mezi takové molekuly patří glycerol a mastné kyseliny s delším řetězcem. Krev z těchto střevních žil vstupuje do jater portální žilou, zatímco lymfa se dostává hrudním mízovodem znovu do krve (Reece a kol., 2011). Unikátem u koní je to, že nemají žlučník, proto je pro ně krmná dávka s vysokým obsahem tuku špatně stravitelná. Ideální množství tuku ve stravě je 3–4 %. Koně dokáží strávit stravu i o obsahu 20 % tuku, avšak návyk na takovou stravu trvá několik týdnů (Williams, 2012).

3.1.5 Tlusté střevo

Prvním oddílem tlustého střeva u koně je slepé střevo (*Cecum*), které je velmi prostorné a spolu s tračníkem, dalším oddílem tlustého střeva, zaujímá 60 % objemu trávicího traktu koně (Reece a kol., 2011; Švehlová, 2010). Slepé střevo zasahuje od pánevního vstupu až na dno dutiny břišní a jeho vrchol na pravé straně sahá k 15. až 14. žeburu. Kraniální část báze slepého střeva patří vývojově k vzestupnému tračníku. Kraniální a kaudální část cekální báze fungují nezávisle na sobě. V důsledku přítomnosti hladké podélné a kruhové svaloviny má slepé střevo a tračník koně přítomny ve stěně výdutě, které umožňují pojmout vysoký objem střevního obsahu a napomáhají k delšímu zadržení tráveniny (Reece a kol., 2011). První trávenina se do slepého střeva dostává asi 3 hodiny po nakrmení a asi za 30–45 minut poté, co opustí žaludek (Santos et al., 2011). Trávenina se z tenkého střeva dostává nejdříve do slepého střeva, kde dochází k intenzivní fermentaci podobně jako v batoru

přežvýkavců. Tento proces však probíhá až za tenkým střevem, úsekem, kde se vstřebává nejvíce živin a z tohoto důvodu nejsou koně schopni tak efektivně zužitkovat vlákninu jako přežvýkavci. Zažítina dále postupuje do tračníku, kde se jeho obsah vlivem dalšího trávení a vstřebávání zahušťuje. Velký kolon je poskládán na sobě a několikrát mění svůj průměr, proto je nebezpečí jeho ucpání či změny polohy některých jeho částí (Švehlová, 2010).

Díky bohatému osídlení tlustého střeva bakteriemi a prvoky je jeho úlohou zpracování rostlinné vlákniny (Švehlová, 2010), absorpce elektrolytů a vody. Slepé střevo je místem, kde pravděpodobně dochází k největší absorpci vody. Zde probíhající mikrobiální trávení je pro koně velmi důležitou funkcí. Za pomoci mikrobiálních enzymů je zde stráveno velké množství rozpustných i nerozpustných sacharidů (celulózy a hemicelulózy), přičemž vznikají mastné kyseliny (Auer and Stick, 2006; Švehlová, 2010). Tělavé mastné kyseliny (TMK) jsou dle Bentze (2014) zdrojem energie pro koně. Vysoká intenzita fermentace tráveniny v tlustém střevě s následnou tvorbou velkého množství organických kyselin vyžaduje velké množství pufrujících látek pro neutralizaci obsahu traktu (Auer and Stick, 2006, Reece a kol., 2011). Mikroorganismy v tlustém střevě také produkují celou řadu vitamínů (Švehlová, 2010) a jsou schopni hydrolyzovat proteiny. Na rozdíl od přežvýkavců mikrobiální protein není pro koně zdrojem aminokyselin, neboť není schopen v dostatečné míře prostoupit stěnou střeva (Sneddon and Argenizo, 1998).

Při správném kmení vytváří mikrobiální populace slepého střeva rovnováhu mezi hostitelem, chrání integritu ekosystému, přispívá k ochraně před vznikem poruch a tvoří ochrannou bariéru před patogeny (Jullian, 1998). Nicméně bakterie jsou také zodpovědné za poruchy, které vznikají při změnách střevního ekosystému vlivem stresových podmínek, které mohou být vyvolány například náhlou změnou krmné dávky (Santos et al., 2011). Při nízkém příjmu škrobu dojde k převážné tvorbě kyseliny octové, jako důsledek fermentace vlákniny. Je produkována bakteriemi *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Selenomonas* a *Streptococcus* (Mackie and Wilkins, 1988; Costa et al., 2012). Naopak vysoký příjem škrobu může způsobit potíže spojené s přílišným mléčným kvašením (Potter et al., 1992; Kienzle, 1994)

Vlivem toho dochází k intenzivnějšímu bakteriálnímu trávení. Dochází zde k výrazné fermentaci přijaté potravy. Fermentační proces pokračuje i v tračníku (Reece a kol., 2011).

3.1.6 Přidatné orgány

Přidatné orgány trávicí soustavy tvoří slinné žlázy, játra a slinivka břišní. Vzhledem k rozdílné skladbě potravy jsou jednotlivé části trávicí soustavy různých skupin zvířat odlišně vyvinuty. Obsahy těchto žláz obsahují elektrolyty, vodu, trávicí enzymy a soli žlučových kyselin. Směs trávicích sekretů umožňuje štěpení potravy, jejíž složky mohou reagovat s epitelovými enzymy (Reece, 2011).

3.2 Chemické složení krmiva

Obsah živin v krmivech lze zjistit za pomoci chemické analýzy. Základní rozbor chemických se z krmivářského hlediska provádí podle Weendenské analýzy, ve které se stanovuje vlhkost (obsah vody) a sušina (zbytek po vysušení). V sušině dále stanovujeme obsah popelovin a organické hmoty (OH). Popelovinami jsou minerální látky. V organické hmotě dále stanovíme dusíkaté látky (NL), tuky a sacharidy. Mezi dusíkaté látky patří bílkoviny a nebílkovinné látky – močovina. K tukům patří i vosky. Ze sacharidů lze odečtem obsahu vlákniny stanovit obsah bezdusíkatých látek výtažkových (BNLV) – tedy polysacharidů (škroby) a monosacharidů (jednoduché cukry). Vlákninu dále dělíme na celulózu, hemicelulózu a lignin (Zeman, 2006).

Dle Pozdíška a kol. (2008) jsou živiny definovány jako látky, které jsou po přijetí a strávení schopny být v organismu zvířete metabolizovány. Jedná se o látky organického i anorganického původu. Organické látky při svém štěpení uvolňují energii a mají schopnost zabudovat se do nově tvořených tkání těla zvířete, případně jeho produktů. Hlavními energetickými živinami jsou sacharidy, tuky a dusíkaté látky. Anorganické látky a voda se sice také podílejí na tvorbě tkání a produktů těla, avšak při jejich štěpení nedochází k uvolňování energie.

3.2.1 Sacharidy

Ve většině krmiv jsou hlavním zdrojem energie sacharidy [Tab.1]. Zatímco monosacharidy mohou být jednoduše absorbovány, složitější sacharidy musejí být nejdříve rozštěpeny na jednodušší cukry. Škroby jsou amylázou rozkládány na disacharid maltózu. Maltóza, sacharóza a laktóza jsou v kartáčovém lemu střeva štěpeny na monosacharidové podjednotky enzymy maltázou, sacharázou a laktázou.

U zdravých koní jsou tyto monosacharidy vstřebávány v tenkém střevě (Williams, 2012). Stejně jako ostatní látky, sacharidy se liší svojí kvalitou, která je určena chemickou a fyzikální strukturou a primárním složením. To ovlivňuje jejich příjem zvířaty, rozsah a rychlost jejich degradace. Pro charakterizování sacharidové složky je mimo hrubé vlákniny nutno stanovit acido detergentní vlákninu (ADF), neutrálně detergentní vlákninu (NDF), obsah škrobu, cukrů a vyhodnotit jednotlivé poměry mezi nimi (Pozdíšek, 2008).

3.2.1.1 Monosacharidy

Nejjednodušší sacharidy, monosacharidy, jsou rozděleny do několika podskupin v závislosti na počtu atomů uhlíku obsažených v jejich molekule na triózy, tetrózy, pentózy, hexózy a heptózy. Triózy a tetrózy se vyskytují jako meziproducty metabolismu sacharidů. Monosacharidy se mohou eliminací kyslíku na vazbách spojovat a vytvářet tak di-, tri-, tetra-, nebo poly-sacharidy. Pojem cukr se omezuje pouze na sacharidy, které obsahují méně než deset monosacharidových zbytků. Ostatní sacharidy jsou často shrnovány pojmem oligosacharidy.

3.2.1.2 Polysacharidy

Polysacharidy, nazývané též glykany, jsou polymery monosacharidových jednotek. Rozdělují se na dvě skupiny – homoglykany obsahující stejný typ monosacharidů a heteroglykany ze kterých hydrolyzou vznikají monosacharidy a jiné deriváty. Významnými pentózami jsou L-arabinóza, D-xylóza a D-ribóza, D-xylulóza a D-ribulóza. Arabinóza je komponent hemicelulózy, vyskytuje se v silážích důsledkem hydrolyzy. Xylany tvoří hlavní řetězec hemicelulózy v travinách. D-ribóza je součástí ribonukleové kyseliny (RNA), komponent vitamínů a koenzymů. Glukóza a fruktóza jsou nejdůležitějšími přirozeně se vyskytujícími hexózami. D-glukóza (hroznový cukr neboli dextróza) se volně vyskytuje v rostlinách, ovoci, medu, krvi a lymfě. V přírodní formě je glukóza krystalická látka rozpustná ve vodě. D-fruktóza (ovocný cukr) se vyskytuje v zelených listech, ovoci a medu. Manóza a galaktóza se v rostlinách vyskytují ve formě polymerů. D-manóza se vyskytuje pouze v polymerizované formě jako manan a jako součást glykoproteinů. Nejrozšířenější je v houbách, kvasinkách a plísních. D-galaktóza se samostatně vyskytuje pouze jako produkt fermentace a je součástí laktózy v mléce, pigmentů antokyanů, galaktolipidů, gum a slizů.

Nejdůležitější heptózou je D-sedoheptulóza účastnící se pentózofosfátového cyklu, sloužícímu k produkci NADPH (McDonald et al., 2011).

Nejvíce se vyskytujícím disacharidem v rostlinách je sacharóza, kde slouží jako hlavní forma dopravy uhlíku. Dalším důležitým disacharidem je maltóza (sladový cukr), vznikající při hydrolýze škrobu v průběhu klíčení ječmene. Cellobióza je základní jednotkou celulózy a její vazby nejsou rozštěpitelné savčími enzymy (mikrobiálními ano). (McDonald et al., 2011).

3.2.1.3 Škroby

Škroby jsou přítomny v mnoha rostlinách jako zásobní polysacharid. Jsou uloženy ve formě granulí (nejvíce v semenech, plodech, hlízách a kořenech). Hlavním komponentem škrobových granulí je glukán, malé složky bílkovin, mastných kyselin a sloučenin fosforu, které mohou ovlivňovat jejich vlastnosti. Škroby jsou až na některé výjimky složeny ze dvou sacharidů – amylozy a amylopektinu, který tvoří 70-80 %. Poměr v zastoupení těchto dvou sacharidů se mění v závislosti na zdroji škrobu. Kvalitu škrobu lze posoudit laboratorně reakcí s jodem, kde temně modré zbarvení způsobuje amyloza a amylopektin modrofialovou až fialovou barvu. Škrobová granula jsou ve studené vodě nerozpustné, po zahřátí však bobtnají a želatinovávají. (McDonald et al., 2011). Píce má obvykle 6-8 % škrobu, v některých případech ho však může mít až 30 % (Williams, 2012).

Meyer et al (1993) sestavili několik faktorů, které mají vliv na precekální stravitelnost škrobu u koní:

- 1) zdroj škrobu,
- 2) zpracování škrobu,
- 3) množství přijatého škrobu,
- 4) zdroj a načasování krmení píce,
- 5) individuální rozdíly mezi koňmi.

Stravitelnost škrobu je oproti jiným sacharidům horší. Schopnost koní produkovat amylázu k jeho štěpení je omezená (asi 8-10 % jako u prasete). Proto velký podíl škrobu v dietě u koní brzdí trávení v tenkém střevě (Pagan, 1998).

3.2.2 Sacharidový komplex

3.2.2.1 Vlákna

Vlákna není chemicky přesně definovaná látka, je to směs látek sestávajících z celulózy, hemicelulózy a nestravitelných inkrustujících látek, zejména ligninu, kutinu, křemičitanů a podobně (Zeman a kol., 2006). Podle vzájemného poměru celulózy a hemicelulózy k ligninu se mění stravitelnost vlákniny a využitelnost krmiva. Množství vlákniny v krmivu lépe vystihuje hodnota NDF, jelikož oproti ADF zahrnuje i hemicelulózu. Se stárnutím rostliny se obsah NDF zvyšuje (Williams, 2006).

Vlákna je odolná vůči štěpení endogenními enzymy v tenkém střevě, tím se dostává do lumen střeva a stává se hlavním substrátem pro bakteriální fermentaci zejména v tlustém střevě. Vzhledem k jejím fyzikálně – chemickým vlastnostem interaguje jak s mikroflórou, tak i sliznicí na všech místech gastrointestinálního traktu. Dle nejnovější definice se vlákna skládá z neškrobových polysacharidů, rezistentního škrobu, nestravitelných oligosacharidů a ligninu. Hlavní součástí celulózy jsou polysacharidy celulóza, beta glukany, arabinózy, xylany, xyloglukany a pektiny (Knudsen, 2016).

Společným znakem vlákniny je schopnost bobtnat a akumulovat vodu v buněčných stěnách. Pouze schopnost zvyšovat viskozitu je závislá na typu a chemické povaze polysacharidů, které jsou ve vláknině obsaženy v malém množství. Vlákna je důležitým dietetickým faktorem, který ovlivňuje trávicí a vstřebávací procesy na všech místech trávicího traktu, stejně tak i vylučování tekutin z pankreatu a jater (Knudsen, 2016).

Jak uvádí Knudsen (2016), zvýšení množství vlákniny v krmivu zvyšuje hmotnost a obsah trávicího traktu a vede k vyššímu průtoku živin. Rozpustná složka vlákniny (β -glukany) zvyšuje viskozitu tráveniny v lumen střev a tím se prodlužuje doba vyprazdňování žaludku. Při trávicím procesu v tenkém střevě vyšší viskozita zabraňuje kontaktu trávicích šťáv s enzymy, tím se zpomaluje pohyb produktů hydrolýzy v procesu trávení. Rozpustná i nerozpustná vlákna slouží jako substrát pro fermentaci mikroflóry tlustého střeva.

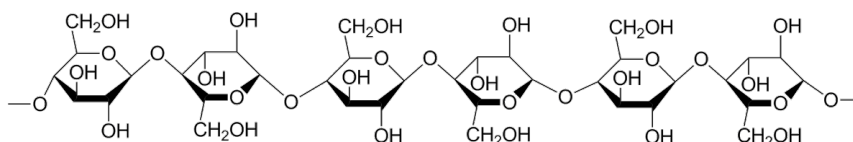
Hlavními metabolity vznikajícími v průběhu mikrobiálního trávení jsou těkavé mastné kyseliny (octová, máselná a propionová), které slouží jako zdroj energie. Velká část rozpustné vlákniny, která je snadno zkvasitelná je trávena ve slepém a tlustém střevě. Nerozpustná vlákna je degradována v kaudální části trávicího traktu, nebo

není strávena vůbec. Vlákna obecně zvyšuje přísun sacharidů do tlustého střeva a tím stimuluje aktivitu mikrobiálního společenstva a snižuje pH (Knudsen, 2016).

3.2.2.2 Celulóza

Celulóza je strukturální sacharid [Obr.3], tvoří základní strukturu rostlinných těl (buněčných stěn). Je úzce spjata s dalšími složkami – hemicelulózami a ligninem. V téměř čisté formě ji lze nalézt v bavlně (McDonald et al., 2011). Celulóza je ve vodě a trávicími enzymy nerozpustný sacharid, k uvolnění těkavých mastných kyselin (TMK) musí být fermentována za pomoci mikrobiálních (celulolytických) enzymů v tlustém střevě (Williams, 2012; Reece a kol., 2011).

Obrázek 3 Strukturální vzorec celulózy



zdroj: <http://paperpools.blogspot.cz/2011//>

3.2.2.3 Hemicelulóza

Hemicelulózy a celulózy jsou strukturálními sacharidy a oproti nestrukturálním polysacharidům jsou obtížněji stravitelné (Williams, 2012). Hemicelulóza je tvořena 150-200 cukernými podjednotkami a rozvětvená obsahuje krátké postranní řetězce složené z různých monomerů sacharidů, které snadno podléhají hydrolýze. Hemicelulóza slouží jako spojení mezi ligninem a celulóзовými vlákny, dodává tak pevnost lignocelulóзовým materiálům (Hendriks et al., 2009).

3.2.2.4 Lignin

Lignin není polysacharid, ale v podstatě nestravitelná sloučenina, která snižuje stravitelnost celulózy a hemicelulózy (Williams, 2012), je vysoce odolný vůči chemické degradaci. Inkrustací rostlinných těl snižuje jejich stravitelnost. Tvoří vazby s mnoha polysacharidy a bílkovinami buněčných stěn, čímž znemožňuje jejich digesci (McDonald et al., 2011). Na lignin jsou bohaté dřevnaté části a stárnoucí rostliny (McDonald et al., 2011; Williams, 2012). Se snižující se stravitelností zároveň klesá dostupnost energie z přijatého krmiva. Na obsah ADF a NDF má také vliv teplota – během horkých letních dní se její množství v rostlinách zvyšuje (Williams, 2012).

Tabulka 1 Podíl jednotlivých sacharidů u běžných krmiv na základě obsahu sušiny

	WSC %	ESC %	Škrob %	NSC %	NFC %
Vojtěškové seno	9,02	7,19	2,02	1,00	30,55
Travní seno	10,77	7,43	2,31	12,85	19,63
Pastvina	10,68	7,78	2,68	13,07	18,38
Oves	3,14	2,53	44,23	48,68	52,18
Kukuřice – celé zrna	3,17	2,42	70,28	73,13	76,63
Ječmen	7,05	2,14	54,62	59,45	64,42
Sójové boby	13,14	10,10	1,96	15,07	27,99

Vysvětlivky: WSC – ve vodě rozpustné sacharidy; ESC – jednoduché cukry; NSC – nestrukturální sacharidy; NFC – nevláknité sacharidy (převzato z myhorseuniversity.com)

3.2.3 Tuky

Tuky fungují jako nositelé elektronů a substrátu v enzymatických reakcích, jsou komponentem membrán a také zdrojem i uložištěm energie. Rostlinné tuky jsou rozděleny na strukturní a zásobní. Strukturní se podílejí na konstrukci membrán (glykolipidy a fosfoglyceridy) a tvoří ochranné vrstvy (vosky). Zásobní tuky jsou obsaženy především v ovoci a semenech ve formě triacylglycerolů (TAG). U zvířat jsou tuky hlavní formou ukládání energie, jejich oxidací se uvolňuje asi 39 MJ/kg DM, z glykogenu je to 17 MJ/kg DM (McDonald et al., 2011).

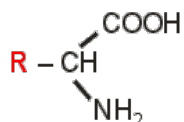
Tuk je nejvýznamnějším zdrojem energie (obsahuje asi 3x více energie, než sacharidy nebo bílkoviny). Tuk je vhodné doplňovat koním v zátěži, rostoucím, nebo v pozdním období březosti. V jiném případě je nejpřirozenějším a dostačujícím zdrojem energie pro koně vláknina nebo škrob. Nedostatek energie se projevuje úbytkem hmotnosti, sníženou fyzickou aktivitou, sníženou produkcí mléka a nižším tempem růstu. Naopak krmení příliš energetickým krmivem může způsobit obezitu, zvyšuje se pocení, riziko koliky, laminitidy a neochoty pracovat (Williams, 2012).

3.3.4 Bílkoviny

Bílkoviny jsou vysokomolekulární organické sloučeniny. Stejně jako sacharidy a tuky obsahují uhlík, vodík a kyslík, ale navíc také dusík a síru. Bílkoviny se nacházejí ve všech živých buňkách, kde jsou úzce spojovány s veškerými biochemickými pochody. Každý živočišný druh má své specifické bílkoviny. Enzymy, kyseliny, nebo

zásady hydrolyticky štěpí bílkoviny na aminokyseliny. Doposud bylo z biologických materiálu izolováno více než 200 různých aminokyselin, avšak pouze 20 z nich se podílí na struktuře bílkovin (bílkovintvorné aminokyseliny) (McDonald et al., 2011).

Aminokyseliny jsou charakterizovány tím, že obsahují amino skupinu $-NH_2$ a karboxylovou skupinu $-COOH$. Většina aminokyselin, vyskytující se přirozeně v bílkovinách, mají amino skupinu připojenou k atomu uhlíku sousedícím s karboxylovou skupinou. Obecný vzorec aminokyselin je prezentován takto:



McDonald et al. (2011) uvádí, že vzhledem k přítomnosti amino skupiny i karboxylové skupiny, jsou aminokyseliny amfoterní (mají zásadité i kyselé vlastnosti). Vzhledem k tomuto amfoternímu charakteru působí AK jako pufrý. Všechny AK vyskytující se ve struktuře bílkovin mají L-konfiguraci. Pokud jsou některé AK do těla dodávány v D-formě, mohou být deaminací přetvořeny na L-formu.

Na rozdíl od rostlin a mikroorganismů, živočišné tělo není schopno si samo vytvořit amino skupinu z jednoduchých dusíkatých látek, a proto musejí být obsaženy v přijímané potravě. Pouze některé AK mohou být vytvořeny z jiných procesem transaminace. Avšak uhlíkatý skelet některých AK syntetizován být nemůže – takové AK jsou nazývány esenciálními. Bílkoviny mají rozdílnou rozpustnost ve vodě – od nerozpustného keratinu po albumin, který je vysoce rozpustný (McDonald et al., 2011).

Bílkoviny, tedy jednotlivé aminokyseliny, jsou využívány pro stavbu svalů během růstu a tréninku. Jejich dobrým zdrojem je sójová moučka a vojtěška. V druhé a třetí seči vojtěšky může být 25-30 % bílkovin. Většina koní vyžaduje obsah bílkovin mezi 8-10 % v krmné dávce (Williams, 2012). Stejného názoru je i Zeman (2008), který jako ideální množství NL uvádí kolem 8 %. Jako důvod uvádí, že koně žijí poměrně dlouhou dobu, a přitom svou živou hmotnost příliš nemění. Přijaté NL tedy slouží spíše jen k regeneraci tkání. Vyšší nároky mají pouze kojící kobyly, rostoucí hříbata a koně v zátěži. Takovému obsahu NL však vyhovuje pouze starší porost trav. V normách je potřeba NL definována jako SNLk a je udávána v gramech. Hodnota norem je považována za minimum příjmu (Zeman, 2008).

Projevem nedostatku bílkovin je hrubá srst, úbytek hmotnosti, menší růst, produkce mléka a výkon. Jejich nadbytek může vést ke zvýšenému příjmu vody s následným vyšším močením a vycouváním, což má za následek dehydrataci a disbalanci elektrolytů (Williams, 2012).

Jak uvádí Willkins (2005), v čerstvé píce je 75-90 % celkového dusíku přítomno ve formě bílkovin. Po sklizni dochází k vysoké proteolýze a po několika dnech, kdy je píce ponechána na louce, může množství bílkovin klesnout až na 50 %. Rozsah degradace závisí na obsahu sušiny v píce, teplotě a rostlinném druhu. Při silážování píce proteolýza sice pokračuje, ale vlivem pH její aktivita klesá. Proteolýzou vznikají aminokyseliny a peptidy, jejich pozdější rozklad je nejvíce zapříčiněn mikrobiálními enzymy a v menší míře i rostlinnými enzymy.

3.3 Objemná krmiva

Koně jsou nepřežvýkaví býložravci, kteří se vyvinuli jako spásači. Pastva je jejich primárním zdrojem potravy a denně stráví až 16 hodin pasením se (Frape, 2004; Virkajärvi et al., 2012). Z tohoto důvodu by měla být strava pro koně složena především z píce – objemného krmiva (Frape, 2004). Pícniny s vysokým obsahem živin lze podávat většině koní jako jediné krmivo (Lingvall, 2006). Luční seno je nejvíce využívanou pící k výživě koní – včetně jeho variací jako je vojtěškové, nebo ovesné seno, v závislosti na geografickém místě a tradicích v krmení (Virkajärvi et. al., 2012).

Objemná krmiva jsou charakteristická nižší koncentrací živin, vyšším obsahem vody, průměrným až vyšším obsahem vlákniny a vysoký obsah alkalických prvků (Ca, K, Na, Mg).

Dle obsahu vody lze objemné krmivo dělit na:

- 1) suchá objemná krmiva – obsah sušiny vyšší než 85,9 % (seno a krmná sláma),
- 2) šťavnatá objemná krmiva – obsah sušiny od 10 do 50 % (zelená píce, siláže, okopaniny, pastevní porost),
- 3) vodnatá krmiva – nízký obsah sušiny (brukvovité pícniny, lihovarské výpalky, škrobárenské zdrtky) (Zeman a kol., 2006).

3.3.1 Travní porosty

Role travních porostů jako zdroje píce je dnes vzhledem k poklesu hospodářských zvířat na ústupu. Do poloviny 20. století bylo obhospodařování travních porostů v Evropě extenzivní, s minimálními vstupy dodatkové energie. Převažoval pozdní termín seči pro získání sena a použití senných drolků jako zdroje osiva (Hopkins and Wilkins, 2006).

Travní porosty se nejčastěji dělí podle původu a doby jejich trvání na tři skupiny – přirozené travní porosty (klimaxové), polopřirozené a umělé (dočasné). Klimaxové porosty představují nepatrný podíl. Vyskytují se ve vysokých nadmořských výškách, stepích a zaplavovaných či zamokřených místech. Polopřirozené vznikají zatravněním orné půdy, nebo vykáceného lesa s minimální dobou trvání 20-50 let (Hejduk a kol., 2003).

Dočasný travní porost je zpravidla pěstován tři roky a většinou na orné půdě (Zeman a kol., 2006; Hejduk a kol., 2003). Jejich obnova je spojena s výsevem či přisevem kulturních druhů trav či leguminóz. Produkce a kvalita píce je na vyšší úrovni, avšak při vyšších vstupech dodatkové energie – obnova, hnojení, pesticidy (Hejduk a kol., 2003).

Trvalý travní porost je travní společenstvo rostlin, které je starší než 5 let, udržuje se přirozeně nebo jsou záměrně kultivovány a nejsou součástí osevních postupů na orné půdě (Hejduk a kol., 2003; Hrabě, 2011). Po založení porostu probíhá 1. fáze sukcese, spojená se značnými změnami v produkci a druhové skladbě. V prvních čtyřech letech je vlivem zastoupení jetelovin v porostu dosahováno vysoké produkce. Od třetího až čtvrtého roku jejich úlohu přebírají volně trsnaté druhy trav (kostřava luční, bojínek luční, srha a jílek vytrvalý). Od pátého až šestého roku dochází k ústupu produkčních trav. Uplatňují se vytrvalejší a méně produkční druhy výběžkatých trav (psárka luční, lipnice luční, kostřava červená a psineček bílý). Mezi pátým až sedmým rokem je změna porostu doprovázena poklesem produkce píce. Následně dojde ke stabilizaci skladby porostu i produkce. Optimální skladba TTP je taková, kde 50-70 % porostu tvoří trávy, které zvyšují chutnost píce, urychlují její zavadání a zvyšují hustotu drnu (Hrabě, 2011). Píce z trav se snadno konzervuje, po vymetání píce rychle stárne (lignifikuje) a obsahuje méně minerálních látek, než dvouděložné rostliny (Hejduk a kol., 2003). Jeteloviny tvoří kvalitní bílkovinnou

složku, v porostu by měly být v množství 15-30 % (Hrabě, 2011). Píce oproti travám pomaleji stárne, ale obtížněji se konzervuje (Hejduk a kol., 2003).

Byliny tvoří dietetickou složku v množství 15-30 % (Hrabě, 2011). Dle Pötscha a Resche (2005) by jejich zastoupení nemělo být vyšší než 30 %. Byliny se vyznačují vyšším obsahem minerálních látek a některé i příznivými účinky na zdraví zvířat (Hejduk a kol., 2003). Žádoucími bylinami jsou smetánka lékařská, jitrocel kopinatý a řebříček (Hrabě, 2011). Některé druhy naopak působí toxicky nebo obsahují množství antinutričních látek (Hejduk a kol., 2003). Mezi nežádoucí byliny patří například šťovík, pryskyřník, rdesno hadí kořen, bolševník a ocún jesenní (Hrabě, 2011). Výsledná skladba porostu je ovlivňována jednak abiotickými vlivy (podmínky stanoviště) i antropogenními vlivy. Jakékoliv narušení vztahu mezi porostem – konzumentem – rozkladači, vznikající mulčováním, jednostranným hnojením či nekosením vede ke zhoršení ekologických poměrů na stanovišti a projevuje se například zvýšením obsahu nitrátů ve vodě, zhoršením úrodnosti půdy a erozí (Hrabě, 2011). Sečné (luční) využívání podporuje rozvoj vysokých trsnatých druhů trav a jetelovin, které tvoří nejvíce píce. V systému, kde jsou prováděny pouze 2 sklizně ročně je podporován rozvoj bylinných druhů – žádoucích i nežádoucích. Optimální volbou vzhledem k hektarové produkci jsou 3 seče ročně. Takováto píce je vhodná k produkci sena a travní siláže. Pastervní využívání podporuje rozvoj nižších výběžkatých druhů trav, které mají větší podíl listových výhonků. Střídavé využívání TTP umožňuje pomocí různých systémů ovlivňovat druhovou skladbu porostu a jeho kvalitu (Hrabě, 2011).

3.3.2 Produkce objemných krmiv

Na rozdíl od většiny ostatních plodin, traviny jsou sklizeny ještě předtím, než fyziologicky dozrají a sklizena je celá jejich nadzemní část. Výběr vhodného času sklizně je závislý na mnoha faktorech. To je také důvod, proč vzniká velká variabilita jejich výživové hodnoty i když se jedná o seče stejné lokality a stejných druhů travin (Virka-Järvi et. al., 2012).

Dle Lingvalla (2006) hodnotu pícnin a volbu způsobu konzervace ovlivňují tři důležité aspekty:

- 1) sklizeň a konzervace v optimálním stupni zralosti/živinové hodnotě,
- 2) zajištění přijatelné hygienické kvality,
- 3) snížení ztrát živin době mezi sklizní píce a jejím zkrmením zvířatům.

Obsah živin v krmivu se mění v závislosti na druhu rostlin, stupni zralosti a ročním období. Příjem objemného krmiva určuje hodnota neutrálně detergentní vlákniny (NDF) – hemicelulózy, celulózy a ligninu, zatímco jeho stravitelnost určuje hodnota acido detergentní vlákniny (ADF) – celulóza a lignin. Se zvyšujícím podílem NDF klesá příjem krmiva a se zvyšujícím se obsahem ADF klesá jeho stravitelnost (Pagan, 1998).

3.3.3 Produkce travní siláže

Jak uvádí McDonald (2011) krmiva, která jsou částečně čerstvá, nebo konzervovaná se vyznačují vysokou variabilitou stravitelnosti a obsahem živin. Předpokladem pro výrobu kvalitní siláže je sklizeň píce o dostatečné kvalitě a zajištění úspěšné konzervace, která bude vést k produkci krmiva s parametry, které se budou jen nepatrně lišit od sklizené píce (Pozdíšek, 2008). Silážování zavadlé píce vede k vyšší výsledné sušině, což má za následek na jedné straně horší růst nežádoucích bakterií a na druhé straně také menší produkce kyseliny mléčné. Konzervace siláže je zajištěna kombinací působení kyseliny mléčné (snížení pH), osmotického tlaku a také přítomností CO₂.

K udržení maximálního množství živin v píci během silážování je důležité co nejdříve minimalizovat aktivitu rostlinných enzymů a podpořit odpovídající mikrobiální fermentaci. Wilkins (2011) uvádí několik zásad, které jsou důležité k produkci kvalitní travní siláže:

- 1) píci sklízet až po době největšího slunečního svitu, kdy má nejvyšší obsah cukrů,
- 2) zavadnutím dosáhnout obsahu sušiny 250 g / kg, tím se sníží ztráty odtokem šťáv,
- 3) eliminovat kontaminaci půdou jako prevence před Klostridiami,
- 4) sekáním dosáhnout zhutnění materiálu a vytěsnění vzduchu,
- 5) při balení zabránit pronikání vzduchu a zahřívání vznikajícím při reakci rostlinných enzymů,
- 6) zajistit vytěsnění zbylého vzduchu (kvůli aktivitě rostlinných enzymů),
- 7) silo důkladně zajistit proti přístupu vzduchu ihned po jeho naplnění.

Pro výrobu kvalitní siláže je důležité co nejrychlejší dosažení anaerobních podmínek a dostatečné snížení vodní aktivity, jako prevence před degradací materiálu

(Wilkins, 2005). Dle Lingvalla (2006) je nevhodná starší a silně zavadlá píce, která se obtížně stlačuje a snadno tak dojde k protržení obalu balíku, ve kterém siláž plesniví a její hygienická kvalita se významně snižuje.

3.3.4 Mikrobiologie travní siláže

Mikroorganismy hrají v konzervačním procesu silážování klíčovou roli. Mikroflóru siláže lze rozdělit na dvě skupiny – na žádoucí (bakterie mléčného kvašení) a nežádoucí mikroflóru. Do druhé skupiny patří bakterie účastníci se kažení siláže za anaerobních podmínek (Klostridie a Enterobakterie). Za anaerobních podmínek kažení způsobují kvasinky, plísně a Listerie (Driehuis and Elferink, 2000). Nežádoucí mikroorganismy mohou buď zhoršovat kvalitu snižováním obsahu živin a chutnosti siláže. Často však představují zdravotní riziko pro zvířata a potažmo i pro člověka (Wilkinson, 1999).

Bakterie mléčného kvašení (BMK) (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*) se v nízkém počtu přirozeně vyskytují na travním porostu. Při sklizni píce dochází k jejich rapidnímu množení (především při zpracování píce nasekáním), které pokračuje i během silážování. BMK způsobují fermentaci ve vodě rozpustných sacharidů za vzniku organických kyselin, převážné kyseliny mléčné a octové, která snižuje pH prostředí. Během silážovacího procesu také dochází k hydrolýze hemicelulózy (Wilkins, 2011).

Klostridie se v silážích vyskytují především při její kontaminaci sporami, které sporulují a rostou pouze za striktně anaerobních podmínek. Sacharolytické Klostridie (*Clostridium butyricum*, *C. tyrobutyricum*) fermentují kyselinu mléčnou a ve vodě rozpustné sacharidy na kyselinu máselnou, která má za následek zvyšování pH siláže. Proteolytické Klostridie (*Clostridium bifermentas*, *C. sporogenes*) fermentují především aminokyseliny na další produkty včetně kyseliny octové a máselné, aminy a amoniak. Pro jejich růst je optimální pH 7 – 7,4 (pH <4,2 jejich růst inhibuje). Klostridie jsou také citlivé na přítomnost vody – pro růst požadují velmi vysokou vlhkost. Pokud je množství sušiny <15 %, jejich růstu nezabrání ani pH < 4. K omezení jejich růstu dochází při sušině kolem 30 % a k inhibici při více, než 40 %. Klostridie způsobují vážné onemocnění botulismus (*C. botulinum*) časté u koní v USA a Baltských zemích (Wilkins, 2011).

Listerie (*Listeria monocytogenes*) se do siláží dostávají kontaminací z půdy. U koní onemocnění Listeriózou není běžné. Listerie se vyskytují v silážích chudých na sušinu a takové koním nejsou běžně krmeny (Wilkins, 2011).

Enterobakterie (*Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*), známé jako koliformní bakterie, jsou na rozdíl od Klostridií fakultativně anaerobní. S bakteriemi mléčného kvašení soupeří o ve vodě rozpustné sacharidy, které fermentují na kyselinu octovou, ethanol a vodík. Degradují aminokyseliny za vzniku vysokých koncentrací amoniaku. Optimální pH pro jejich růst je kolem 7 (Wilkins, 2011).

Kvasinky (rody *Candida*, *Saccharomyces* a *Torulopsis*) způsobují znehodnocování siláží po jejich vystavení vzduchu. Většina plísní je aerobní a vyskytují se především ve svrchní vrstvě siláží, kde produkují mykotoxiny. Siláž, která byla vystavena degradaci na vzduchu by vzhledem ke zdravotnímu riziku neměla být zkrmována (Wilkins, 2011).

Tabulka 2 Hlavní skupiny mikroorganismů přítomných v silážích

Druh bakterií	Zdroj	Substrát	Metabolity
Enterobakterie (koliformní bakterie)	Splašky, chlévská mrva, půda	Cukry rozpustné ve vodě	Kyselina octová, ethanol, CO ₂ , amoniak
Kvasinky	Povrch rostlin, obiloviny	Cukry rozpustné ve vodě	Etanol, CO ₂
Homofermentativní BMK	Povrch rostlin, obiloviny	Cukry rozpustné ve vodě	Kyselina mléčná
Heterofermentativní BMK	Povrch rostlin, obiloviny	Cukry rozpustné ve vodě	Kyselina mléčná, kyselina octová, ethanol, manitol, CO ₂
Klostridie	Půda	Kyselina mléčná, bílkoviny, aminokyseliny	Kyselina máselná, kyselina octová, CO ₂ , H ₂ , aceton, butandiol, aminy, amoniak

zdroj: <http://www.vuzv.cz/sites/SilazRada.pdf>

3.3.5 Krmení travní siláže koním

Přísun vláknitého krmiva je pro koně důležitý – podporuje správnou funkci trávicího traktu, částice krmiva zpomalují průchod trávicím traktem, zvyšují příjem sušiny a stimulují příjem vody. Mimo to, častý příjem krmiva redukuje výskyt behaviorálních poruch (stereotypního chování) (Lingvall, 2006). Konzervovaná píče, jako je travní siláž, má oproti ostatním krmivům výhodu, že lze jednoduše hodnotit její kvalitu. Siláž při správné výrobě a skladování již nemění své živinové složení. Z tohoto důvodu se lze při sestavování krmných dávek [Tab. 3] spolehnout na jednu již stanovené parametry (Saastamoinen, 2012). Správný krmný management vyžaduje znalost nutriční hodnoty podávaného krmiva. Na základě toho je travní siláž kombinována s jinými krmivy. Koně dávají přednost konzervovaným silážím o nižší sušině, neboť je pro ně chutnější. Mnoho chovatelů má však ze siláže obavy, ať už na základě varování veterináře, nebo z důvodu pachu kyselin (Lingvall, 2006). Bezpečné použití siláže souvisí také se znalostí její senzorické jakosti, která se posuzuje podle barvy, která by měla být zelená (zelenavě-nažloutlá), mírně vlhké konzistence a bez zápachu po plísních (Saastamoinen, 2012).

Dle Lingvalla (2006), by koně měli mít přístup ke krmivu ve formě sena, pastvy, nebo konzervovaného krmiva v minimálním množství 1 % ž. hm. denně, to je v rozporu s jinými autory, kteří udávají hodnoty vyšší. Saastamoinen (2012) publikuje doporučení množství objemného krmiva v rozmezí 1,5-3 % ž. hm. u dospělých koní, pro travní siláž je doporučuje množství 2-2,8 % ž. hm. Obsah stravitelné energie v travní siláži je v rozmezí 7,8-9,5 MJ/kg sušiny, obsah proteinu je udáván od 70 do 160 g/kg sušiny (Saastamoinen, 2012).

Bergero et al. (2002) uvádí, že travní siláž s množstvím stravitelné energie (Se_k) 9,8 MJ/kg sušiny a obsahem NL 111 g/kg, konzumovaná v množství 2 % živé hmotnosti může nahradit energetické požadavky všech tříd koní, pouze mimo těch ve vysoké zátěži, nebo prvním měsíci laktace. Zároveň taková dávka krmiva může překročit potřebu bílkovin u všech skupin koní, kromě kobyl v prvním měsíci laktace. Pokud je taková travní siláž krmena v množství 2,5 % ž. hm., dokáže pokrýt i energetické nároky koní ve vysoké zátěži, kromě kobyl v prvním měsíci laktace. Důležité je upozornit, že i přes dostačující hodnoty bílkovin, nemusí být vzhledem k limitujícím aminokyselinám aminokyselinové složení siláže vhodné. Požadavek lysinu březích kobyl dle NRC.

Travní siláž o nízké koncentraci živin a stravitelné energii 9,1 MJ/kg sušiny, obsahu bílkovin 70 g/kg sušiny je schopna naplnit požadavky koní bez zátěže, nebo pouze v lehké zátěži při konzumaci v množství 2 % ž.hm. Travní siláž z pozdní seče, s nízkým obsahem proteinu, krmena v množství 3,1 % ž. hm. by postačila energetickým nárokům všech tříd koní, kromě kobyly v prvním měsíci laktace (Bergero et al., 2002). Lingvall (2006) však udává, že maximální denní příjem sušiny pro koně je 2-3 % ž. hm.

Tabulka 3 Denní potřeba živin pro koně, dle živé hmotnosti a stupně zatížení

Živá hmotnost (kg)	Pracovní zátěž	Sušina (kg)	SEk (MJ)	NL (g)	Lys	Ca (g)	P(g)	Na (g)
400	Lehká	6,8	67,1	559	24	24	14	11,1
	Střední	7,6	78,3	614	26	28	17	14,2
	Těžká	9,4	89,5	689	30	32	23	20,4
500	Lehká	8,4	83,9	699	30	30	18	13,9
	Střední	9,3	97,9	768	33	35	21	17,8
	Těžká	11,5	118,9	862	37	40	29	25,5
600	Lehká	9,9	100,7	839	36	36	22	16,7
	Střední	11	117,5	921	40	42	25	21,3
	Těžká	13,6	134,3	1034	44	48	30	30,6

zdroj: NRC (2007)

3.4 Stravitelnost krmiva

Stravitelnost krmiva je úzce spojena s jeho chemickým složením. Nejvíce je stravitelnost ovlivněna zastoupením frakcí vlákniny – důležité je její množství a kvalita. Moderní analytické metody se snaží oddělovat vlákninu tvořící buněčné stěny od té, která tvoří buněčný obsah. Po zahřátí vzorku krmiva v neutrálně detergentním roztoku se buněčný obsah rozpustí a zbydou buněčné stěny – reziduum nazývané NDF. Obsahy buněčných stěn jsou téměř kompletně stravitelné. Stravitelnost buněčných stěn je mnohem nižší a závisí na stupni lignifikace. Ta je vyjádřena jako množství ADL (acid detergentní lignin) (McDonald et al., 2011). Lignin samotný je nestravitelný a představuje nejvýznamnější faktor omezující stravitelnost buněčných

stěn pro býložravce (Gruber et al., 2011). Struktura rostlinných tkání (McDonald et al., 2011) souvisí se stářím rostliny, proto je stáří sklizené píce důležitým faktorem její stravitelnosti (McDonald, 2002). Na stravitelnost má velký vliv druh rostlin (McDonald, 2011), faktory stanoviště, úroveň výživy rostlin, povětrnostními podmínkami, termínem a rychlostí sklizně, včetně následné konzervace (Hejduk a kol., 2013).

Například tropické rostliny jsou mnohem méně stravitelné, neboť jejich listy obsahují více cévních svazků a v důsledku toho i mnohem více ligninu, také mají i husté masy buněk, které je chrání před invazí mikroorganismů (McDonald, 2011). Čepele trav jsou daleko bohatší na buněčný obsah, zejména na bílkoviny a obsahují mnohem méně buněčných stěn ve srovnání se stébly (Míka a Paul, 1985). Z toho vyplývá, že stravitelnost narůstá s vyšším podílem listů (Míka et al., 1997).

Kvalita krmiva je mimo chemického složení a samotné kvality porostu charakterizována také zdravotní nezávadností, chutností a zejména stravitelností jednotlivých živin (Micek et al., 2001). Nízká stravitelnost krmiva se obvykle odráží v nízkém příjmu krmiva zvířetem (Van Soest, 1994). Roe et al. (1991) uvádějí, že degradace živin je ovlivňována velkým množstvím faktorů, jako je charakter či složení jednotlivých frakcí krmiva, individualita zvířete, celkové složení krmné dávky a způsob jeho podávání. Dle Pozdíška a kol. (2008) jsou tyto hodnoty zároveň ovlivňovány i biologicky účinnými látkami – vitamíny, enzymy a hormony, ale i antinutričními látkami. Pro ostatní druhy nutrientů, jako jsou vitamíny a minerály, znamená vyšší stravitelnost krmiva jejich vyšší dostupnost díky efektivnější absorpci (KER, 2016).

Zelenka (2013) se s ostatními autory shoduje, že hlavním faktorem, který rozhoduje o biologické využitelnosti krmiva je stravitelnost. Tato jednotka se využívá jako měřítko využitelnosti krmiva. Jak uvádí McDonald (2011), potenciální hodnota krmiva je zjistitelná chemickou analýzou. Avšak jeho skutečná hodnota může být posouzena až na základě ztrát, které vznikají během trávení, jeho absorpce a metabolizování.

3.5 Metody stanovení stravitelnosti

Stravitelnost je definována jako množství krmiva, které bylo absorbováno v trávicím traktu a nebylo vyloučeno pomocí faeces. První a největší ztráty tvoří živiny, které nejsou absorbovány a jsou vyloučeny faeces. Je vyjádřena koeficientem stravitelnosti, nebo procenty dle výpočtu:

$$\text{zdánlivá stravitelnost} = \frac{\text{množství přijaté sušiny} - \text{množství sušiny vyloučené výkaly}}{\text{množství přijaté sušiny}}$$

3.5.1 Stanovení stravitelnosti *In vivo*

In vivo stravitelnost živin se stanovuje vždy u několika kusů zvířat. Čím je jejich počet vyšší, tím jsou výsledky přesnější a spolehlivější (Zelenka, 2013). Nejčastěji je využíváno čtyř kusů zvířat. Měla by být stejného druhu, věku a pohlaví – i tak se jejich schopnosti trávení trochu liší. Samci, či kastráti jsou upřednostňováni před samicemi, neboť je u nich jednodušší separovat faeces od moči (McDonald, 2011).

3.5.1.1 Bilanční stravitelnost

Bilanční stravitelnost je nejspolehlivější metodou měření stravitelnosti. Metodika je nákladná, časově náročná a zdlouhavá (Khan et al., 2003), vyžaduje dlouhé přípravné období, po které je zvíře a mikroorganismy jeho trávicího traktu, zvykány na krmnou dávku (Schneider and Flatt, 1977). Bilanční testy také vyžadují velké množství hodnoceného krmiva (Jančík, 2009). Během testu je zvíře drženo v individuálním boxu za takových podmínek, aby bylo možné co nejpřesněji provést kvantitativní sběr faeces. Pro odhad dusíkové bilance je odebírána i moč. Minimální počet zvířat jsou 3 kusy a doba trvání se pohybuje od 7 do 21 dní (Khan et al., 2003). Shromážděné faeces se smísí dohromady a rozmíchají. Z této směsi je odebrán reprezentativní vzorek, který je analyzován. Na základě rozdílných hodnot živin přijatých v krmivu a živin ve stolici je vypočítán koeficient stravitelnosti (Schneider and Flatt, 1977).

Stravitelnost té samé živiny v různých krmivech může být rozdílná. Rozdíl mezi biologickou využitelností živin a jejich stravitelností je v tom, že část živin se může vstřebat ve formě, která je pro zvíře nevyužitelná. Bilanční stravitelnost zanedbává význam živin endogenního původu (živiny trávicích šťáv, žluči, hlenu, epiteliálních buněk, a tp.). Vliv těchto endogenních živin pro výpočet je tím větší, čím je nižší přísun živin krmivem. Což znamená, že v extrémním případě může být výsledek bilanční stravitelnosti záporný (Zelenka, 2013).

Skutečná stravitelnost je oproti bilanční stravitelnosti více objektivnější přiblížení stravitelnosti, která zohledňuje uvedené nepřesnosti způsobené živinami endogenního původu (KER, 2016).

3.5.1.2 Indikátorová metoda

Jednou z metod využívaných k posouzení stravitelnosti je indikátorová metoda, u které není nutný sběr veškerých exkrementů jako u bilanční stravitelnosti (Kahn et al., 2003). Ve vzorcích krmiva je nejdříve stanoven obsah potenciálně nestravitelných složek (například celulóza, nerozpustný popel, barviva, nestravitelná ADF, nestravitelná NDF, nestravitelná celulóza, nebo kutin). Vhodnost daného markeru k použití se stanovuje na základě procentuální shody jeho stravitelnosti s koeficientem stravitelnosti vypočítaným na základě bilančních pokusů. Složky jsou poté použity k predikci stravitelnosti organické hmoty ve vzorcích krmiv o známém množství organické hmoty. V pracích, které se zabývaly testováním krmiv byly výsledky získané za použití celulózy přesnější než při použití popele jako markeru. (Penning and Johnson, 2009).

3.5.1.3 Stravitelnost in sacco

Ke zkoumání trávení koní v oblasti tenkého střeva je možné využít přenesenou metodu *in sacco*, která je především používána u přežvýkavců. Jde však o invazivní metodu vyžadující kanylaci koně a není ji možné použít u zvířat využívaných ve sportu. Sáčky naplněné zkoumaným krmivem jsou umístěny do trávicího traktu koně na požadovanou dobu a po skončení jsou vyjmuty za pomoci magnetu. Zbytek nestráveného krmiva v sáčcích slouží k dalším laboratorním stanovením (DeFombelle et al., 2004).

3.5.2 Stanovení stravitelnosti In vitro

Pomocí *in vitro* metod lze zjistit stravitelnost krmiv, ale nelze zjistit průběh trávení v čase, a tudíž rychlost trávení (Jančík, 2009). K přesnějšímu zjišťování obsahu, složení a efektivitě využití strávených živin je nezbytné kvantitativní vyjádření kinetiky trávení (Lopéz et al., 1998).

3.5.2.1 Dvoustupňová analýza „Two stage“

Dvoustupňová („Two-stage“) *in vitro* analýza byla vyvinuta Tilleyem a Terryem v roce 1963 k hodnocení stravitelnosti sušiny (DM) v píci. Metoda byla v první řadě vyvinuta pro přežvýkavce, ale její modifikace umožňují použití i pro koně. Na *in vitro* hodnocení má vliv několik faktorů. Největším zdrojem variability výsledků je inokulum

(Johnson, 1969), které je ovlivněno potravou zvířete, které je jeho dárce (Knipfel and Troelsen 1966). Následná variabilita je také důsledkem velikostí částic substrátu (vzorku), váhou substrátu, poměrem inokula a pufru (McLeod and Minson, 1969) a délkou trvání prvního stupně této techniky (Troelsen and Hanel, 1966). Principiálně se vzorek krmiva nejdříve inkubuje v odebrané tekutině (inokula) a poté 24 hodin v roztoku z pepsinu a HCl, za stálého míchání. Po skončení této fáze je vzorek 24 hodin vystaven působení roztoku celulózy (Tilley and Terry, 1963).

Bylo testováno několik modifikací této metodiky s cílem redukovat variabilitu několika vyskytujících se faktorů (Alexander and McGowan, 1966; Van Soest, 1970; Goering and Van Soest, 1970; Nelson et al., 1972; Sayre and Van Soest, 1972; Grant et al., 1974). V mnoha laboratořích jsou zaváděny modifikace této metody bez znalosti možných důsledků těchto změn. Na základě této *in vitro* metodě lze hodnotit degradovatelnost NDF (Jančík, 2009).

3.5.2.2 Stanovení stravitelnosti za použití přístroje ANKOM Daisy^{II} Inkubátor

Principem této metody je stanovení stravitelnosti s gravimetrickým stanovením rozdílu hmotnosti vzorku po skončené fermentaci. Přístroj Daisy^{II} Inkubátoru simuluje princip fermentace, který probíhá *in situ*-v trávicím traktu zvířete (Míka a kol., 1982). V první fázi je vzorek zatavený v sáčcích umístěn do kontejneru s proteolytickým enzymem. V druhé fázi jsou vzorky umístěny do roztoku celuláz s definovanou aktivitou. Metoda poskytuje při relativně malých nárocích na obsluhu a nákladech na provoz přesné a dobře reprodukovatelné výsledky. Do jedné vsádky by se měli vkládat relativně stejnorodé vzorky, které se neliší v obsahu látek modifikujících průběh fermentace (Míka a kol., 2009). Earing et al. (2010), Lattimer (2007) a Lowman (1999) se na základě provedených experimentů shodují, že inokulum vytvořené z koňských faeces je vhodnou náhražkou bachorové tekutiny využívané u přežvýkavců. A dodávají, že za současného použití přístroje ANKOM Daisy^{II} Inkubátoru lze získat spolehlivé výsledky srovnatelné s *in vivo* experimenty.

3.5.2.3 *In vitro* pepsin-celulázová rozpustnost

Pepsin celulázová rozpustnost využívá průmyslově vyráběných enzymů ke stanovení stravitelnosti krmiv. Je založena na napodobení trávicího traktu působením pepsinu, HCl a celulázového roztoku na testované krmivo. V první fázi je vzorek inkubován v roztoku pepsinu a HCl. Ve druhé fázi jsou inkubovány v roztoku

celulázy a acetátovém pufru. U každé série je také inkubován vzorek pro korekci o známé *in vivo* stravitelnosti (Jančík, 2009). Výpočet stravitelnosti krmiv je možný na základě predikčních rovnic (rovnic vícenásobné regrese) sestavených na základě předchozích *in vivo* pokusů (Kahn et al., 2003).

4 Materiál a metody

V metodické části diplomové práce budou popsány laboratorní postupy a výpočty, které byly použity k laboratornímu stanovení jednotlivých živin a následně k výpočtu živinového složení jednotlivých vzorků a ke stanovení a výpočtu stravitelnosti.

Vzorky travních siláží použité ke stanovení živinového složení a následné *in vitro* stravitelnosti poskytl Národní hřebčín Kladruby nad Labem. Travní siláže pochází ze sklizně na začátku října roku 2015, jedná se o 3. seč. Sklizený travní porost slouží jako louka k trojsečnému využívání. Porost se každoročně obnovuje – na podzim se provádí chemické pročištění od plevelů a starý porost se zaoře. Na jaře se pozemky osévají travní směsí. Na stanovištích se vyskytuje kyselá půda způsobující expanzi plevelů (pryskyřníků) a následné potlačení růstu kulturních druhů trav. To má velký vliv na výslednou skladbu porostu. V oblasti převládají půdy písčité a hlinitopísčité. Vyrobené siláže pocházejí z několika lokalit, které se svými podmínkami mírně liší. Jedná se o louky mírně vlhkých až příležitostně vlhkých stanovišť. Porost byl nejdříve posekán a nechán zavadat, aby bylo dosaženo vyšší sušiny. Zavadlá píce byla při sklizení rovnou lisována do kulatých balíků a zabalena do vzduchotěsné fólie. Z pěti vybraných balíků travní siláže byly odebrány vzorky, které byly následně zpracovány ke stanovení živinového složení a stravitelnosti v laboratořích České zemědělské univerzity v Praze.

4.1 Příprava vzorků k analýze

4.1.1 Úprava vzorků předsoušením

Pomůcky a přístroje:

- laboratorní váha, plata na sušení vzorků, sušárna.

Postup úpravy:

Plato určené k navažování vzorků bylo umístěno na váhu, váha vytárována a následně na něj bylo naváženo požadované množství vzorku. Každý vzorek byl označen papírkem s popisem a uvedenou váhou. Odvážené vzorky byly vysoušeny při 50 °C po dobu 48 h. Současně bylo zajištěno neustálé odvětrávání nedovřenými

dvířky. Po uplynutí doby byly vzorky vyndány a ponechány 24 h na vzduchu, aby získaly rovnovážnou vlhkost. Nakonec se plata se vzorky zvážíli.

Výpočet předsušiny:

$$\text{předsušina} = \frac{\text{váha vzorku po vysoušení}}{\text{váha vzorku před vysoušením}} \times 100$$

4.1.2 Úprava vzorků mletím

Pomůcky a přístroje:

- mlýnek, 3x síto (4 mm, 2 mm, 1 mm), vzorkovnice, lihový popisovač.

Postup:

Před použitím mlýnku je provedena kontrola, zda je řádně vyčištěný – mohlo by dojít ke kontaminaci nových vzorků. Postupným semletím vzorků byl získán materiál k analýze o velikosti částic 1 mm. V průběhu mletí byly prachovnice označeny popiskem, který byl umístěn i dovnitř pro případ, že by došlo k smytí vnějšího označení. Semletý a homogenizovaný vzorek se naplní do připravených prachovnic

4.3 Stanovení živin vzorků travních siláží

4.1.1 Stanovení sušiny a popelovin

Pomůcky a přístroje pro stanovení sušiny:

- analytická váha, vysoušecí misky (spalovací kelímky), kovová lžička, sušárna, exikátor.

Postup stanovení sušiny:

Po 4 h sušení spalovacích kelímků v sušárně při teplotě 105 °C a následném vychladnutí v exikátoru (asi 1 h) byla stanovena jejich hmotnost s přesností na 0,0001 g. Následně bylo s přesností na 0,0001 g naváženo 5 g vzorku a kelímky umístěny

do předeřáté sušárny na 4 h při konstantní teplotě 105 °C. Vzorčky se stanovenou sušinou byly po vychladnutí v exsikátoru zváženy s přesností na 0,0001 g.

Výpočet sušiny:

$$sušina = \frac{\text{hmotnost vysušeného kelímku} - \text{hmotnost prázdného kelímku}}{\text{hmotnost navážky}} \times 100$$

Pomůcky a přístroje pro stanovení popelovin:

- analytická váha, misky (spalovací kelímky), kovová lžička, muflová pec, exsikátor.

Postup stanovení popelovin:

Ke stanovení popelovin bylo použito stejných vzorků, u kterých byla předem již stanovena sušina. Spalovací kelímky byly umístěny do muflové pece a při 550 °C spalovány asi 6 h. Kelímky lze z muflové pece vyjmout až pokud teplota klesne na 100 °C, poté byly vloženy do exsikátoru minimálně na 1 h, dokud nezchladnou. Poté byly zváženy s přesností na 0,0001 g.

Výpočet popelovin:

$$Popel = \frac{\text{hmotnost vysušeného kelímku} - \text{hmotnost kelímku po spálení}}{\text{hmotnost navážky}}$$

Ze stanovených hodnot se následně vypočítá obsah organické hmoty:

$$\text{organická hmota} = \text{sušina} - \text{popeloviny}$$

4.3.2 Stanovení obsahu tuku

Pomůcky a přístroje:

- frity (extrakční patrony), extrakční baňky, obvazová vata, analytická váha, petroléter, přístroj SER 148 Solvent Extractor.

Postup stanovení tuku:

Pro krmiva rostlinného původu je určena metoda přímo extrahovatelných tuků. Do extrakční patrony bylo naváženo 5 g vzorku s přesností na 0,001 g a uzavřeno tukuprostou vatou. Patrona byla umístěna do předem vysušené a zvážené extrakční baňky. Po přidání potřebného množství extrakčního činidla (petrolétheru) byly baňky umístěny na vyhřívací zařízení v přístroji a tuk extrahován 3-5 hodin. Stanovené vzorky byly 1,5 h v sušeny při teplotě 95–98 °C. Po vychladnutí v exsikátoru byl vzorek zvážen s přesností na 0,001 g.

Obrázek 4 Přístroj SER 148 Solvent Extractor pro extrakci tuků



zdroj:<https://www.google.cz/url?sa=i&rct>

Výpočet obsahu tuku:

$$Tuk = \frac{\text{hmotnost baňky s extrahovaným tukem} - \text{hmotnost prázdné baňky}}{\text{navážka}} \times 100$$

4.3.3 Stanovení dusíkatých látek Kjeldahlovou metodou

Hrubá bílkovina (celkové množství dusíku) je definován jako množství dusíku, stanovený dle Kjeldahlovy metody. Hrubá bílkovina zahrnuje dusík bílkovinného i nebílkovinného původu. Obecně platí, že obsah dusíku v bílkovinách je 16 %, inverzní číslo k tomuto je 6,25 ($100/16=6,25$) a používá se jako koeficient pro přepočítání volného N na dusíkaté látky (NL). Nicméně mezi jednotlivými surovinami se tento koeficient liší, proto je hodnota hrubého obsahu bílkovin odlišná od obsahu čistých bílkovin. Pro přesnou analýzu je potřeba odečíst nebílkovinný dusík, který se stanoví ve filtrátu po deproteinizaci kyselinou trichloroctovou, nebo taninem.

Varem organické dusíkaté látky s koncentrovanou kyselinou sírovou dojde k její mineralizaci. Přítomný dusík se převede na amoniak, který zůstane vázán ve formě síranu amonného. Alkalizací mineralizovaného vzorku se uvolní amoniak, který se kvantitativně předestiluje s vodní párou do předlohy, kde se určí titrací.

Materiál a přístroje:

- přístroj Kjeltect™ 2400 Auto Analyzer firmy FOSS, mineralizátor, 30 % NaOH, 1 % H_3BO_3 , 98 % H_2SO_4 , destilovaná voda, peroxid vodíku, KH_2O_6 , Tashirův indikátor (100 ml 0,1 % alkoholového roztoku methylčerveně smícháme s 50 ml 0,1 % alkoholického roztoku bromkresolové zeleně), mineralizační katalyzátor – tablety Kjeldahl, vzorek bílkoviny (travní siláž).

Postup stanovení dusíkatých látek:

Do mineralizační tuby s naváženými 0,5 g vzorku s přesností na 0,001 g byl přidán katalyzátor (tableta Kjeldahl) a 10 ml 98 % H_2SO_4 . Po smíchání těchto látek bylo přidáno 10 ml peroxidu vodíku (s peroxidem je nutné pracovat pod odsávací digestoří – dochází k bouřlivé reakci a uvolňování par). Po proběhnutí chemické reakce a nasazení odsávání byly mineralizační tuby umístěny do vyhřátého mineralizačního hnízda po dobu 1 h při 420 °C. Odtah z tub se až do skončení mineralizace a vychladnutí vzorků nesmí sundat, jinak hrozí udušení. Po sejmutí z mineralizačního hnízda tuby 30 minut chladly. Chladný vzorek byl naředěn 10 ml destilované vody (brání zpětné krystalizaci vzorku). Jednotlivé tuby byly vkládány do destilačního přístroje Kjeltect™ 2400 Auto Analyzer. V přístroji byl přidáním nadbytku NaOH vytěsněn dusík ve formě amoniaku a jímán do předlohy (1 % kyselina boritá obarvená metylčervení a bromkresolovou zelení).

4.3.4 Stanovení acidodetergentní vlákniny (ADF) a neutrálně detergentní vlákniny (NDF)

Acidodetergentní vláknina (ADF) je lignocelulózový zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv, který stanoví vážkově po kyselé hydrolyze vzorku krmiva v prostředí kyselého roztoku cetyltrimetylamonium bromidu.

Materiál a přístroje:

- analytická váha, kádinka, odměrný válec, filtrační sáčky F57, popisovač odolný proti rozpouštědlům, kovová lžička, impulsní svářečka, magnetická míchačka, přístroj ANKOM²⁰⁰ fibre analyzer, filtrační sáčky, sušárna, exikátor, spalovací kelímky, muflová pec.

Příprava roztoku pro stanovení NDF:

Chemikálie:

- destilovaná voda, EDTA, tetraboritan sodný, laurylsíran sodný, triethylenglykol, hydrogenfosforečnan sodný bezvodý, siřičitan sodný, amyláza, aceton.

Postup přípravy roztoku:

V kádince s odměřenými a ohřátými 2 l destilované vody bylo rozpuštěno 37,22 g EDTA a 13,62 g tetraboritanu sodného, následně i 60 g laurylsíranu sodného a 23 g bezvodého hydrogenfosforečnanu sodného. Po úplném rozpuštění všech látek bylo přidáno 20 ml triethylenglykolu a roztok se nechal odstát do druhého dne.

Postup stanovení NDF:

V části roztoku připraveného pro stanovení NDF bylo rozpuštěno 20 g siřičitanu sodného. Filtrační sáčky se vzorkem byly vloženy do nosiče a umístěny do analyzátoru ANKOM²⁰⁰. Po provedení kontroly uzavření vypouštěcího kohoutu byly sáčky zality roztokem siřičitanu rozpuštěného v NDF, přilít i zbytek roztoku NDF a 4 ml amylázy. V důkladně uzavřeném analyzátoru se zapnutým mícháním a topením byla při 100 °C prováděna 60 minut analýza. Po vypnutí topení a míchání byl roztok vypuštěn. (Vypuštěním roztoku dojde ke snížení přetlaku uvnitř nádoby a víko je možné otevřít). Filtrační sáčky byly zality horkou destilovanou vodou, přidáno 4 ml amylázy, zapnuto míchání a 5 minut prováděno promývání. Tento krok byl ještě jednou opakován. Potřetí bylo prováděno promývání bez amylázy. Nakonec byly vzorky zchlazeny promytím

studanou destilovanou vodou. Nosič byl vyjmut a ze vzorků vymačkána přebytečná voda, následně byly vzorky promývány 5 minut v acetonu. Na filtračním papíru byly vzorky 1 h odvětrávány (nesmí se umísťovat do sušárny, pokud se aceton kompletně neodpaří – riziko výbuchu). V sušárně přehřáté na 105 °C byly sáčky 4 h sušeny a následně 1 h chladly v exsikátoru. Vzorky byly zváženy s přesností na 0,0001 g.

Příprava roztoku pro stanovení ADF:

Chemikálie:

- destilovaná voda, kyselina sírová, cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), aceton.

Postup:

Do kádinky se odměří 2 l destilované vody a přidá 13,66 ml 96 % kyseliny sírové. Ve vzniklém roztoku se rozpustí 40 g CTAB. Roztok se nechá odstát do druhého dne.

Postup stanovení ADF:

Filtrační sáčky se vzorky, u kterých byla stanovena NDF byly vloženy do nosiče a umístěny do nádoby analyzátoru ANKOM²⁰⁰. Po kontrole funkčnosti míchání a topení byl vypouštěcí kohout uzavřen a obsah zalit roztokem pro stanovení ADF. U uzavřeného analyzátoru bylo zapnuto míchání a topení. Po dosažení teploty 100 °C byl nastaven časovač na 60 min. Po ukončení této fáze byl roztok vypuštěn (tím klesne tlak v nádobě a může být otevřeno vrchní víko). Vzorky byly zality horkou destilovanou vodou, zapnuto míchání a 5 minut prováděno promývání, poté byla voda vypuštěna. Tento krok byl dvakrát opakován. Po zchlazení vzorků studanou destilovanou vodou byl nosič vyjmut a ze sáčků vymačkána přebytečná voda, poté byly 5 min promývány v acetonu. Vzorky se na filtračním papíře ponechali 1 h odvětrat, dokud se aceton neodpařil, následně byly 4 h sušeny v sušárně přehřáté na 105 °C. Po usušení vzorky chladnuly 1 h v exsikátoru a následně byly zváženy s přesností na 0,0001 g.

Po 4 h vysoušení při teplotě 105 °C a 1 h zchlazení v exsikátoru, byly spalovací kelímky zváženy a s vloženými filtračními sáčky umístěny do muflové pece, kde byly při teplotě 550 °C přibližně 6 h spalovány. Po poklesu teploty na 100 °C bylo možné kelímky vyjmout z pece do exsikátoru. Kelímky byly váženy s přesností na 0,0001 g.

Výpočet NDF a ADF:

$$NDF(ADF) = \frac{w_3 - (w_1 \times c)}{w_2} \times 100$$

$$c = \frac{w_3}{w_1}$$

w_3 = hmotnost sáčku po analýze – w_4

w_4 = hmotnost kelímku po spálení – hmotnost prázdného kelímku

c = korekce; w_1 = hmotnost prázdného sáčku; w_2 = navážka vzorku;

4.4 Stanovení *In vitro* stravitelnosti krmiv pomocí přístroje Daisy^{II} Incubator

U vzorků travní siláže byla stanovena stravitelnost *in vitro* pomocí přístroje Daisy^{II} Incubator (Ankom Technology Corp.). Pro stanovení stravitelnosti byly použity různé inkubační roztoky. Pro přípravu prvního byly jako zdroj očkovací látky využity čerstvé koňské faeces. Druhým inkubačním roztokem byl roztok pepsinu a následně roztok celulózy (pepsin-celulázová rozpustnost). Stravitelnost byla stanovena pro sušinu a organickou hmotu.

4.4.1 Příprava vzorků

Materiál a přístroje:

- mlýnek CYCLOTEC 1093 Sample Mill, filtrační sáčky Ankom Technology (F57), analytická váha, pulsní svářečka, aceton, kovová lžička, tužka.

Postup přípravy vzorků:

Vzorky krmiv byly namlety na velikost částic 1 mm. Filtrační sáčky byly proprány 3-5 minut v acetonu, vysušeny 4 h při 105 °C a označeny tužkou. Sáčky byly zváženy a hmotnost zaznamenána (w_1). Do filtračních sáčků bylo naváženo 0,5 g vzorku (w_2) s přesností na 0,0001 g, poté zataveny a umístěny do digesční nádoby přístroje. Od každého byly naváženy 3 sáčky (5 druhů krmiv) a jeden prázdný pro korekci.

4.4.2 Stanovení *in vitro* stravitelnosti pomocí koňských faeces

Pomůcky a přístroje:

- kádinka, analytická váha, kovová lžička, navažovací sklíčko, magnetická míchačka, odměrný válec, pipeta se špičkou určená pro úpravu pH, přístroj Daisy^{II} Incubator, prachovnice, termoska, malá a velká bomba s CO₂, plastová nálevka, sýrařské plátno (2x), sušárna, exikátor, spalovací kelímky, muflová pec.

Chemikálie:

destilovaná voda, chemikálie použité na pufrční roztoky A a B [Tab. 4]

Tabulka 4 Chemikálie k přípravě pufrčních roztoků

roztok A	roztok B
10 g/l KH ₂ PO ₄	15 g/l Na ₂ CO ₃
0,5 g/l MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1 g/l Na ₂ S · 7 H ₂ O
0,5 g/l NaCl	
0,1 g/l CaCl ₂ · 2 H ₂ O	
0,5 g/l Močovina	

Provedení odběru koňských faeces:

Použití koňských faeces k přípravě inokula nevyžaduje chirurgický zákrok na zvířeti. Zároveň jsou zdrojem mikroorganismů s dostatečnou fermentační aktivitou, která zaručí jejich bezproblémové využití v *in vitro* hodnocení při zachování reálného odrazu trávení zvířete.

K odběru faeces pro přípravu inokula byl využit 10 let starý valach plemene Český teplokrevník o hmotnosti 500 kg, který je chován v boxu s pravidelným přístupem na pastvu. V průběhu experimentu byl krmen 2x denně (ráno a večer) standardní krmnou dávkou zahrnující seno a oves. Kůň byl v dobrém zdravotním stavu, odčervěný s platným očkovacím průkazem. Míra fyzické zátěže byla střední - příprava do drezury stupně L. Celkem byly odebrány tři vzorky čerstvé stolice, které byly homogenizovány.

Postup stanovení *in vitro* stravitelnosti:

Veškeré použité náčiní (laboratorní sklo, termoska, miska mixéru, destilovaná voda v prachovnicích) bylo nutné nejdříve temperovat na teplotu 50 °C. Následně byly smíchány pufrční roztoky v poměru 5:1 (1500 ml roztoku A a 300 ml roztoku B). Roztok byl upraven na pH 7 (přiléváním roztoku B do roztoku A) a přelit do Daisy^{II}

Inkubátoru, kde byl za stálého míchání zahříván na 39 °C, 30 minut před přidáním inokula. Vzorky krmiv byly přidány až po dosažení požadované teploty.

Sýrařská plátina byla namáčena v destilované vodě, vyždímána a v kádince byla temperována na 50 °C v sušárně.

Do termosky byla nalita teplá destilovaná voda, sloužící pro její výhřev až do odběru faeces. Před odběrem byla voda vylita a do termosky odebrány čerstvě vykálené koňské faeces (termoska se zaplní až po okraj). Během plnění termosky byl odebíraný materiál sycen pomocí bomby s CO₂.

V laboratoři bylo odváženo 200 g faeces a zality 400 ml pufrčního roztoku, připraveného v přístroji Daisy^{II} Inkubátor. Obsah byl mixován při vysokých otáčkách, poté přefiltrován skrz dvojitou vrstvu plátina do kádinky. Při obou těchto krocích bylo zajištěno stálé sycení CO₂. Kádinka, do které byl obsah přeléván, byla udržována při teplotě 39 °C za pomoci vodní lázně. Inokulum bylo za stálého sycení CO₂ přelito do digesčních nádob vyjmutých z Daisy^{II} Inkubátoru. Při požadované teplotě 39 °C, byla započata inkubace po dobu 48 h. Po inkubaci byla tekutinu z nádob vylita a sáčky vyjmuty. Sáčky byly promývány studenou destilovanou vodou a následně sušeny 24 h při teplotě 50 °C, poté 1 h v exsikátoru chladly. Filtrační sáčky byly zváženy.

Spalovací kelímky byly usušeny 4 h při teplotě 105 °C a následně nechány zchladnout v exsikátoru. Do zvážených kelímků byly vloženy filtrační sáčky a spáleny v muflové peci při 550 °C. Při poklesu teploty na 100 °C, bylo možné spalovací kelímky vyndat a nechat zchladit 1 h v exsikátoru. Vychladlé kelímky byly zváženy s přesností na 0,0001 g. Ze získaných hodnot byla vypočítána stravitelnost.

4.4.3 Stanovení *in vitro* stravitelnosti pomocí pepsin-celulázové rozpustnosti

Pomůcky a přístroje:

- kádinka, analytická váha, kovová lžička, navažovací sklíčko, magnetická míchačka, odměrný válec, přístroj Daisy^{II} Incubator, sušárna, exsikátor, spalovací kelímky, muflová pec.

Chemikálie:

- destilovaná voda, kyselina chlorovodíková, pepsin, octan sodný, kyselina octová, celulóza

Příprava roztoků:

1. Pepsinový roztok-do kádinky s odměřeným a ohřátým 1 l destilované vody bylo přidáno 8,8 ml kyseliny chlorovodíkové. Ve vzniklém roztoku byly rozpuštěny 2 g pepsinu.
2. Celulázový roztok-do kádinky s odměřeným a ohřátým 1 l destilované vody bylo přidáno 0,6 ml kyseliny octové. Ve vzniklém roztoku bylo rozpuštěno 1,36 g octanu sodného a poté 5 g celulázy.

Postup stanovení *in vitro* stravitelnosti:

Předem připravený pepsinový roztok byl přelit do digesčních nádob a byly přidány. Inkubace vzorků probíhala 24 h při 39 °C. Poté byly digesční nádoby vyjmuty a inkubační roztoky vylity, následně umístěny do sušárny, kde byly zahřívány po dobu 30 min na 80 °C, aby došlo k inaktivaci pepsinu. Po inaktivaci pepsinu následovalo propírání vzorků v horké destilované vodě, které bylo provedeno celkem třikrát. V dalším kroku byl do suchých a čistých digesčních nádob přelit předem připravený celulázový roztok a následně probíhala inkubace vzorků 24 h při 39 °C. Po uplynutí doby inkubace byly digesční nádoby opět vyjmuty a inkubační roztoky vylity. Následovalo propírání vzorků v horké destilované vodě, které bylo provedeno celkem třikrát. Promyté vzorky byly poté po dobu 5 min proprány v acetonu. Vzorky byly 1 h ponechány k odvětrání a následně probíhalo sušení při 105 °C. Po vysušení byly vzorky vloženy na 1 h ke zchlazení do exsikátoru a následně zváženy s přesností na 0,0001 g. V další části byly vzorky vloženy do předem vysušených a zvážených spalovacích kelímků a byly spáleny při 550 °C. Po spálení byly spalovací kelímky vloženy na 1 h ke zchlazení do exsikátoru a následně zváženy s přesností na 0,0001 g. Z hodnot byla vypočítána stravitelnost.

Obrázek 5 DaisyII incubator



4.5 Výpočet stravitelnosti

4.5.2 Stravitelnost sušiny

$$DMR = (m_3 - m_1) \times c_1$$

$$DMD = 100 - \frac{100 \times DMR}{m_2 \times DM} [\%]$$

- DMR - hmotnost vzorku po inkubaci a vysušení (bez sáčku) [g]
- DMD - stravitelnost sušiny [%]
- DM - obsah sušiny ve vzorku (% / 100)

4.5.3 Stravitelnost organické hmoty

$$AR = (m_4 - m_1) \times c_2$$

$$OMD = 100 - \frac{100 \times (DMR - AR)}{m_2 \times DM \times OM}$$

$$c_2 = \frac{m_4}{m_1}$$

DMR - hmotnost vzorku po inkubaci a vysušení (bez sáčku) [g]

DMD - stravitelnost sušiny (%)

AR - hmotnost vzorku po inkubaci, vysušení a spálení (bez sáčku) (g)

OMD - stravitelnost organické hmoty (%)

DM - obsah sušiny ve vzorku (% / 100)

OM - obsah organické hmoty v sušině vzorku (% / 100)

m_1 - hmotnost prázdného sáčku (g)

m_2 - navážka vzorku (g)

m_3 - hmotnost sáčku se vzorkem po inkubaci a vysušení (g)

m_4 - hmotnost sáčku se vzorkem po inkubaci a spálení (g)

c_1 - korekce-sušina (hmotnost sáčku po inkubaci/hmotnost prázdného sáčku)

c_2 - korekce-popel (hmotnost sáčku po mineralizaci/hmotnost prázdného sáčku)

5 Výsledky

V laboratoři bylo pět vzorků travní siláže podrobena analýze živinového složení a za pomoci uvedených vzorců byly spočítány hodnoty jednotlivých živin. Zjištěné hodnoty jsou prezentovány v uvedených tabulkách.

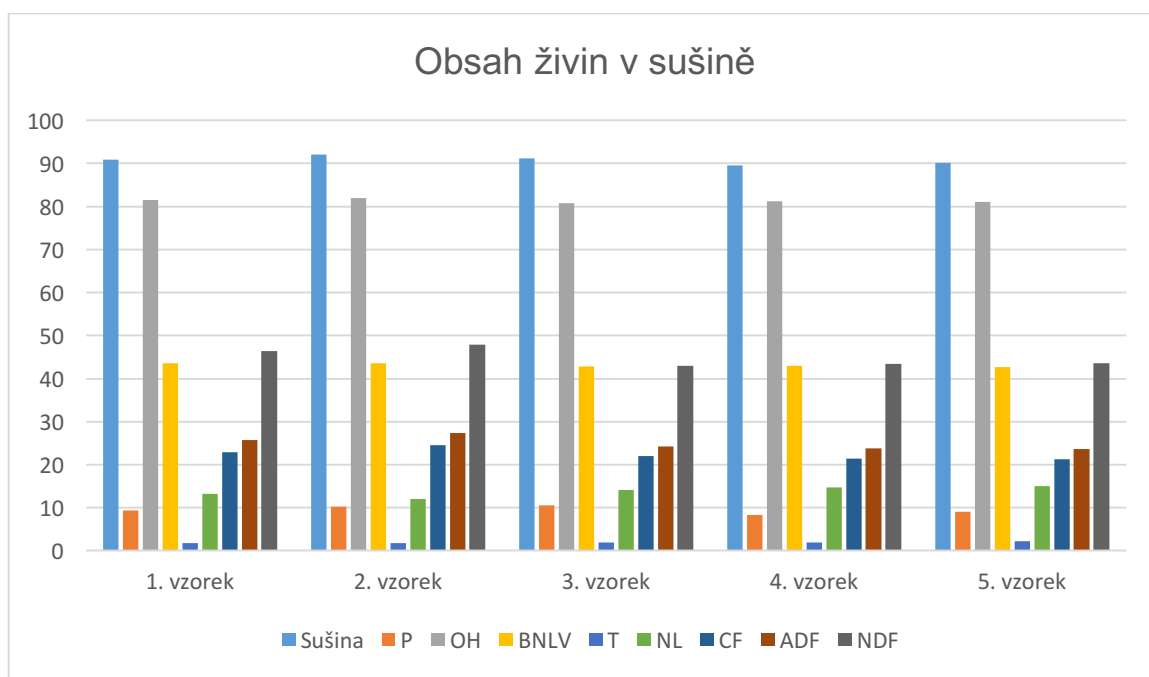
5.1 Živinové složení travní siláže

Tabulka 5 Živinové složení u travní siláže v sušině vzorků

Vzorek	S %	P %	OH %	BNLV	T %	NL %	CF %	ADF	NDF
1	90,83	9,33	81,50	43,59	1,72	13,25	22,95	25,74	46,39
2	92,11	10,18	81,93	43,51	1,80	12,03	24,58	27,29	47,93
3	91,22	10,51	80,71	42,76	1,85	14,14	21,96	24,30	42,94
4	89,50	8,27	81,23	43,05	1,99	14,75	21,45	23,81	43,41
5	90,12	9,03	81,09	42,62	2,29	14,97	21,20	23,65	43,56

S = sušina, P = popeoviny, OH = organická hmota, BNLV = bezdušikaté látky výtažkové, T = tuk, NL = dusíkaté látky, CF = hrubá vláknina, ADF = Acido detergentní vláknina, NDF = neutrálně detergentní vláknina

Graf 1 Obsah živin v sušině

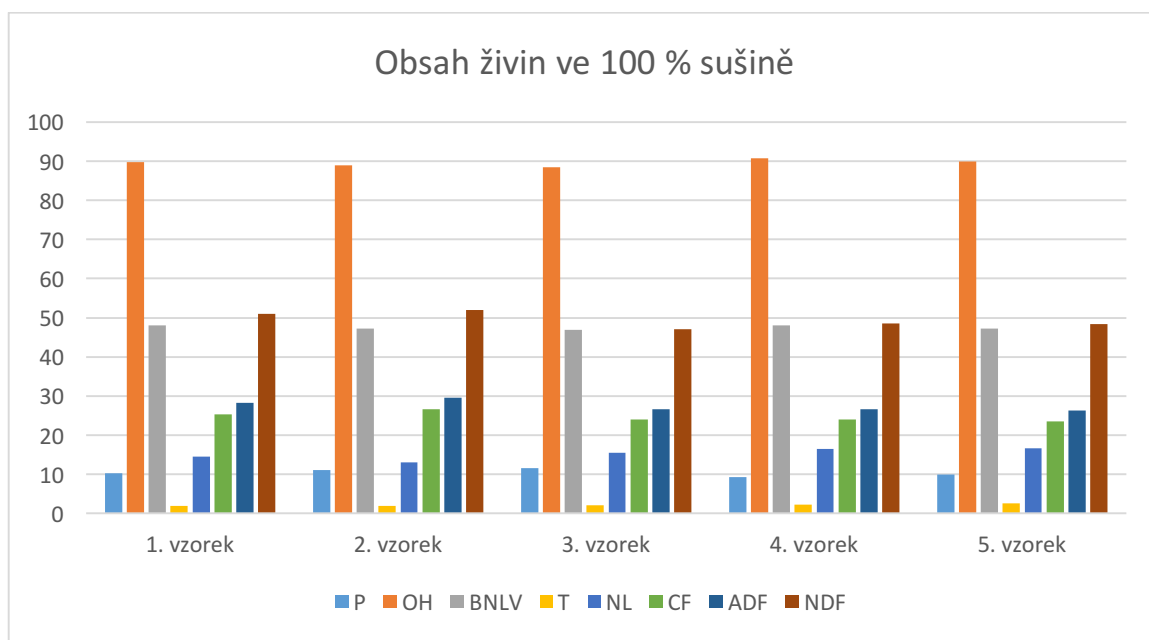


Tabulka 6 Živinné složení travní siláže ve 100 % sušinně

Vzorek	S %	P%	OH %	BNLV	T %	NL %	CF %	ADF	NDF
1	100	10,27	89,73	47,99	1,89	14,59	25,26	28,33	51,07
2	100	11,05	88,95	47,24	1,96	13,06	26,69	29,63	52,04
3	100	11,52	88,48	46,88	2,03	15,50	24,07	26,65	47,07
4	100	9,24	90,76	48,10	2,22	16,48	23,96	26,60	48,50
5	100	10,02	89,98	47,29	2,54	16,62	23,53	26,24	48,34

S = sušina, P = popeoviny, OH = organická hmota, BNLV = bezdusíkaté látky výtažkové, T = tuk, NL = dusíkaté látky, CF = hrubá vláknina, ADF = Acido detergentní vláknina, NDF = neutrálně detergentní vláknina

Graf 2 Obsah živin ve 100 % sušinně



Nejvyšší rozdíl hodnot vzorků se vyskytuje v obsahu NL (13,06 % u 2. vzorku a 16,61 % u 5. vzorku) a u CF (23,52 % u 5. vzorku a 26,68 % u 2. vzorku). Obsah popelovin je nejnižší u 4. vzorku (9,24 %) a nejvyšší u 3. vzorku (11,52 %). Podíl organické hmoty je nejvyšší u 4. siláže (90,76 %) a nejnižší u 3. siláže (88,47 %). BNLV je nejméně v 3. vzorku (46,88 %) a nejvíce ve 4. vzorku (48,1 %). Tuku je nejméně obsaženo v 1. vzorku (1,89 %) a nejvíce v 5. vzorku (2,54 %). Nejvíce NL je obsaženo v 5. siláži (16,62 %), nejnižší u 2. siláže (13,06 %). Nejvyšší obsah CF je u 2. vzorku (26,69 %), nejnižší obsah je v 5. vzorku (23,52 %). Siláž č. 2 obsahuje nejvíce NDF (26,69 %), nejnižší obsah je v 5. vzorku (23,52 %). Siláž č. 2 obsahuje nejvíce NDF

(52,04 %), nejméně NDF je obsaženo ve 3. vzorku (47,07 %). Obsah ADF je nejvyšší u 2. siláže (29,63 %) a nejnižší u 5. siláže (26,23 %).

5.2 In vitro stravitelnost travních siláží

Získané hodnoty stravitelnosti za použití různých inkubačních roztoků byly porovnány pomocí párového *t*-testu. K vyhodnocení výsledků byl použit statistický program STATISTICA. Pomocí regresní analýzy byla vyhodnocena stravitelnost.

Hypotézy:

Tabulka 7 In vitro stravitelnost v sušině vzorků

Vzorek	DMR (FAE)	DMR (Pepcell)	OMD (FAE)	OMD (Pepcell)
1	50,05	67,17	43,46	62,87
2	44,92	63,99	39,37	60,86
3	54,99	70,30	50,16	69,61
4	58,77	70,23	52,85	66,38
5	58,09	71,25	52,76	67,8

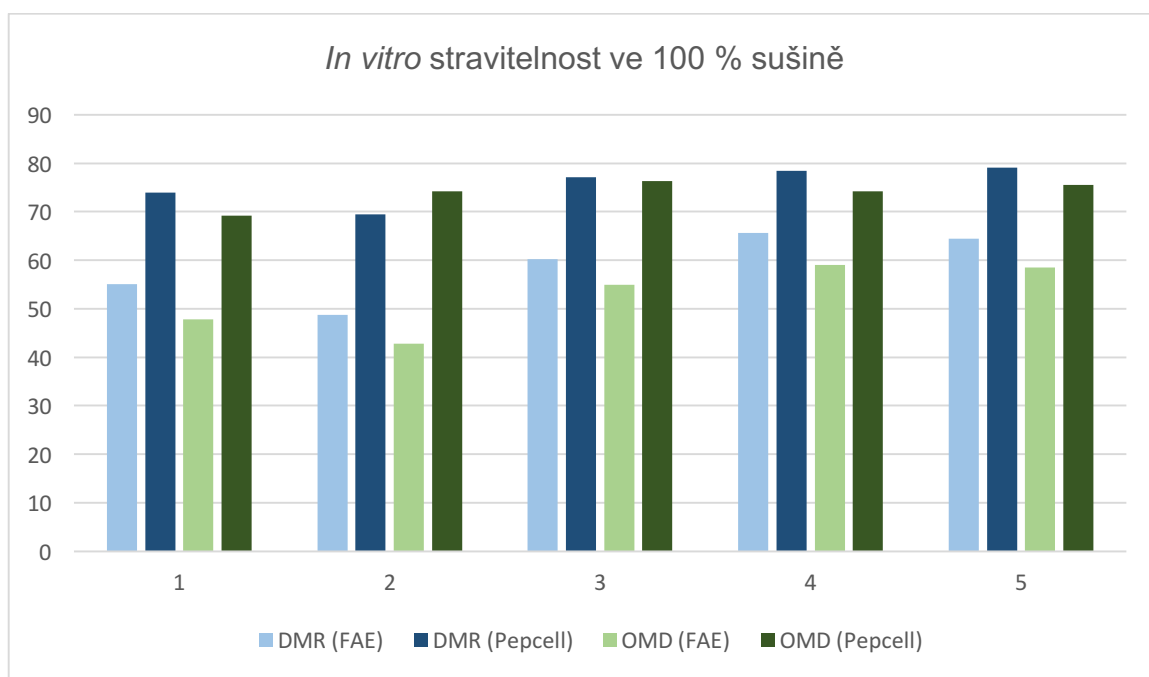
vysvětlivky: DMR (FAE) = stravitelnost sušiny v inkubačním roztoku z faeces; OMD (FAE) = stravitelnost organické hmoty v inkubačním roztoku z faeces; DMR (Pepcell) = stravitelnost sušiny v pepsin-celulázovém roztoku; OMD (Pepcell) = stravitelnost organické hmoty v pepsin-celulázovém roztoku

Tabulka 8 In vitro stravitelnost, přepočet na 100 % sušinu

Vzorek	DMR (FAE)	DMR (Pepcell)	OMD (FAE)	OMD (Pepcell)
1	55,10	73,95	47,85	69,22
2	48,77	69,47	42,74	74,28
3	60,28	77,07	54,99	76,31
4	65,66	78,47	59,05	74,17
5	64,46	79,06	58,54	75,52

vysvětlivky: vysvětlivky: DMR (FAE) = stravitelnost sušiny v inkubačním roztoku z faeces; OMD (FAE) = stravitelnost organické hmoty v inkubačním roztoku z faeces; DMR (Pepcell) = stravitelnost sušiny v pepsin-celulázovém roztoku; OMD (Pepcell) = stravitelnost organické hmoty v pepsin-celulázovém roztoku

Graf 3 *In vitro* stravitelnost ve 100 % sušině



Nejvyšší rozdíl hodnot se vyskytuje u stravitelnosti organické hmoty stanovené za pomoci inkubačního roztoku z koňských faeces, hodnoty u vzorku č. 2 a 4 se pohybují v rozpětí 42,74 % -59,05 %. Mezi vzorky se stanovenou stravitelností sušiny za pomoci inkubačního roztoku z koňských faeces má nejnižší zjištěnou stravitelnost vzorek č. 2 (48,77 %) a nejvyšší stravitelnost vzorek č. 4 (65,66 %). Stravitelnost stanovená za pomoci pepsin-celulézového inkubačního roztoku se celkově pohybovala ve vyšších hodnotách než stravitelnost stanovená za pomoci inkubačního roztoku z koňských faeces. Stravitelnost organické hmoty byla nejnižší u vzorku č. 1 (69,22 %) a nejvyšší u vzorku č. 3 (76,31 %). Stravitelnost sušiny byla nejnižší u vzorku č. 2 (69,47 %) a nejvyšší u vzorku č. 5 (79,06 %).

5.2.1 H1 Inkubační roztoky neovlivňují získané hodnoty *in vitro* stanovení stravitelnosti vybraných živin v travní siláži

Tabulka 9 Popisné charakteristiky souboru dat

Proměnná	Popisné statistiky					
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.	Var.koef.
DMD (pep-cel)	15	68,58944	63,61990	71,66580	2,790133	4,06788
DMD (faeces)	15	53,36600	44,76000	61,82000	5,586578	10,46842
OMD (pep-cel)	15	65,50267	60,43000	73,58000	3,598318	5,49339
OMD (faeces)	15	47,71933	38,74000	57,37000	5,876519	12,31476

Stanovení vědeckých hypotéz:

H₁₀-Inkubační roztoky neovlivňují získané hodnoty *in vitro* stanovení stravitelnosti vybraných živin v travní siláži

H_{1A}-Inkubační roztoky ovlivňují získané hodnoty *in vitro* stanovení stravitelnosti vybraných živin v travní siláži

Tabulka 10 Výsledky t-Testu pro závislé vzorky DM

Proměnná	t-test pro závislé vzorky Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$							
	Průměr	Sm.odch.	Rozdíl	Sm.odch. rozdílu	t	p	Int. spolehl. -95,000%	Int. spolehl. +95,000%
DMD (pep-cel)	68,58944	2,790133						
DMD (faeces)	53,36600	5,586578	15,22344	3,090492	19,07791	0,000000	13,51198	16,93490

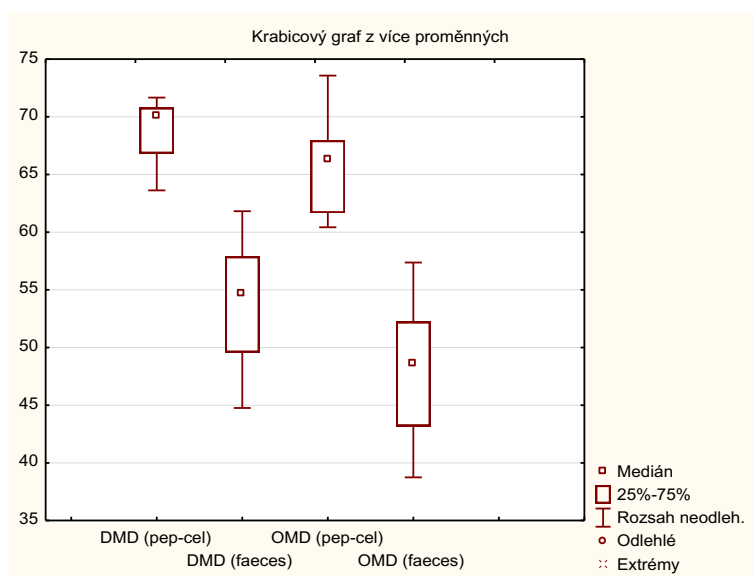
$p < 0,05$; zamítáme H₁₀; přijímáme H_{1A}

Tabulka 11 Výsledky t-Testu pro závislé vzorky OM

Proměnná	t-test pro závislé vzorky (Statistika_hodnoty) Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$							
	Průměr	Sm.odch.	Rozdíl	Sm.odch. rozdílu	t	p	Int. spolehl. -95,000%	Int. spolehl. +95,000%
OMD (pep-cel)	65,50267	3,598318						
OMD (faeces)	47,71933	5,876519	17,78333	3,973898	17,33174	0,000000	15,58266	19,98400

$p < 0,05$; zamítáme H₁₀; přijímáme H_{1A}

Tabulka 12 Krabicový graf výskytu četností



Stanovené hodnoty stravitelnosti mají nerovnoměrné rozložení. U pepsin-celulázového inkubačního roztoku se vyskytují vyšší nepřesnosti stanovení.

5.2.2 H₂ mezi inkubačními roztoky neexistuje korelace ve výsledcích stanovení in vitro stravitelnosti živin

Stanovení vědeckých hypotéz:

H₂₀-mezi inkubačními roztoky neexistuje korelace ve výsledcích stanovení in vitro stravitelnosti živin

H_{2A}-mezi inkubačními roztoky existuje korelace ve výsledcích stanovení in vitro stravitelnosti živin

Tabulka 13 Vyjádření závislosti korelační maticí

Proměnná	Korelace Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$ N=15 (Celé případy vynechány u ChD)					
	Průměry	Sm.odch.	DMD (pep-cel)	DMD (faeces)	OMD (pep-cel)	OMD (faeces)
DMD (pep-cel)	68,58944	2,790133	1,000000	0,944473	0,837969	0,935469
DMD (faeces)	53,36600	5,586578	0,944473	1,000000	0,747603	0,989823
OMD (pep-cel)	65,50267	3,598318	0,837969	0,747603	1,000000	0,749317
OMD (faeces)	47,71933	5,876519	0,935469	0,989823	0,749317	1,000000

Červeně vyznačená pole značí vzájemnou korelaci stravitelnosti živiny (OM a sušiny) a použitého inkubačního roztoku.

Tabulka 14 Regresní analýza DMD (faeces) a DMD (pep-cel)

		Výsledky regrese se závislou proměnnou : DMD (pep-cel) R= ,94447271 R2= ,89202871 Upravené R2= ,88372322 F(1,13)=107,40 p<,00000 Směrod. chyba odhadu : ,95142					
N=15		b*	Sm.chyba z b*	b	Sm.chyba z b	t(13)	p-hodn.
Abs.člen				43,41655	2,441383	17,78359	0,000000
DMD (faeces)		0,944473	0,091134	0,47170	0,045516	10,36351	0,000000

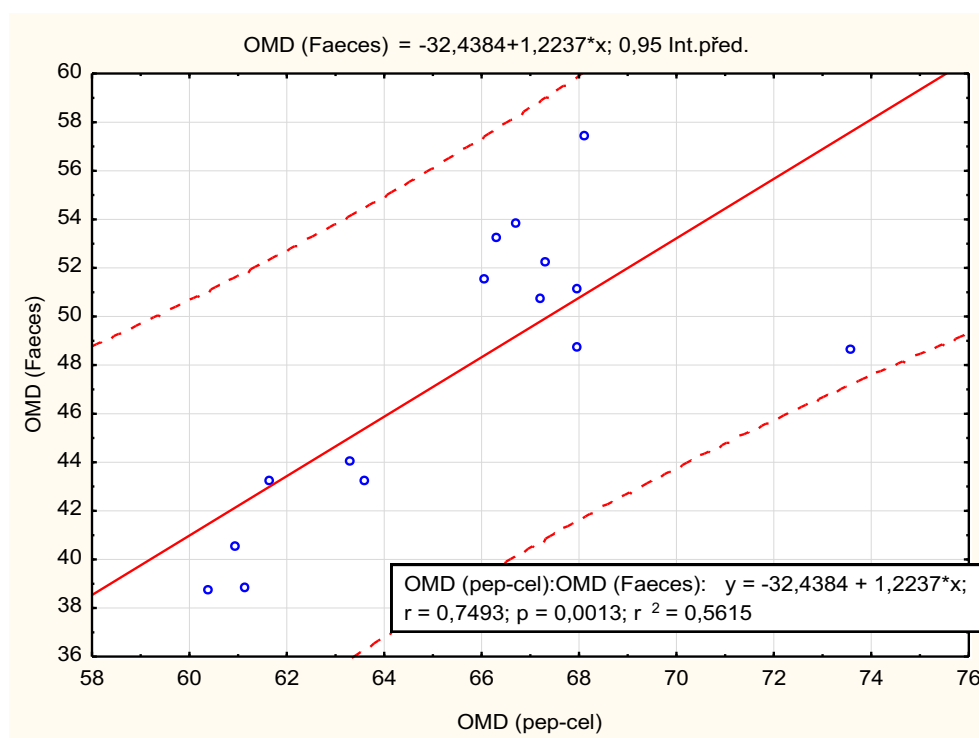
p <0,05; existuje statisticky významný rozdíl; koeficient determinace různý od nuly $r^2 = 0,56$; zamítáme H_{20} ; přijímáme H_{2A} .

Tabulka 15 Regresní analýza OMD (faeces) a OMD (pep-cel)

		Výsledky regrese se závislou proměnnou : OMD (pep-cel) R= ,74931727 R2= ,56147637 Upravené R2= ,52774378 F(1,13)=16,645 p<,00130 Směrod. chyba odhadu : 2,4728					
N=15		b*	Sm.chyba z b*	b	Sm.chyba z b	t(13)	p-hodn.
Abs.člen				43,60794	5,404439	8,068912	0,000002
OMD (faeces)		0,749317	0,183664	0,45882	0,112462	4,079819	0,001301

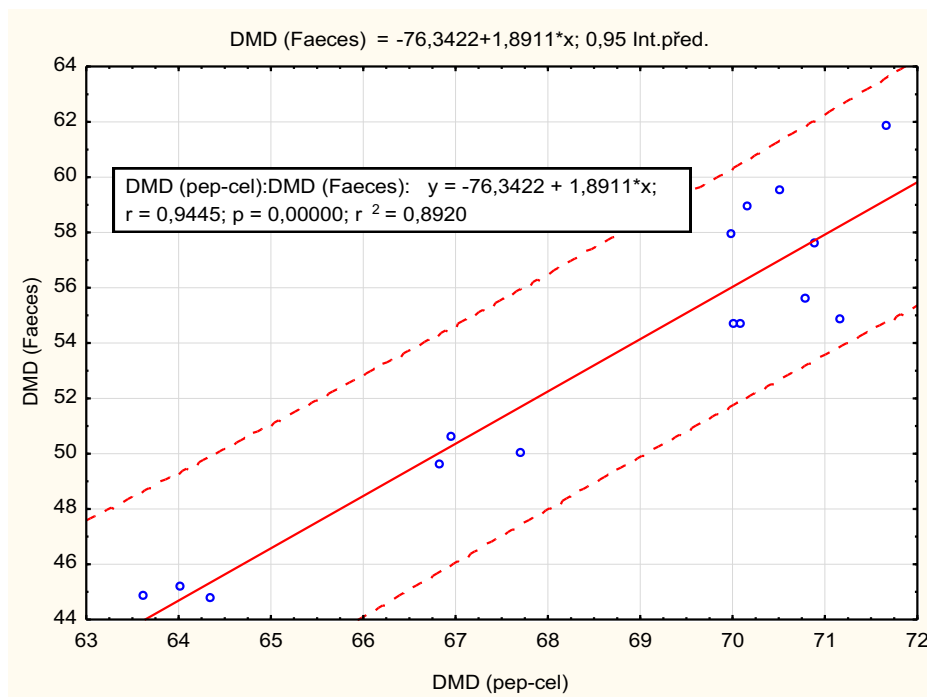
p <0,05; existuje statisticky významný rozdíl; koeficient determinace různý od nuly $r^2 = 0,56$; zamítáme H_{20} ; přijímáme H_{2A} .

Graf 4 Závislost inkubačních roztoků na základě korelační analýzy



Korelační koeficient $R=0,75$, což značí silnou závislost mezi vzorky.

Graf 5 Závislost inkubačních roztoků na základě korelační analýzy



Korelační koeficient je $R=0,94$, což značí silnou závislost mezi vzorky. Z grafického znázornění je patrná pozitivní korelace – roztoky poskytují hodnoty ve stejném rozložení.

6 Diskuse

Chemické složení travních siláží je shrnuto v Tabulce 3 a Tabulce 4. Mezi jednotlivými vzorky siláží nebyly zjištěny významné rozdíly. Největší rozdíl byl zaznamenán u NL (13,06 % a 16,61 %). Forejtová et al. (2005) uvádí hodnotu 13,6 %, která se rovná spodní hodnotě u našich vzorků. Pozdíšek a kol. (2008) udávají, že u kvalitní travní siláže je obsah NL 14 %. Této hodnotě je nejbližší siláž č. 1, která obsahuje 14,59 % NL a lze ji tedy v tomto směru považovat za vyhovující. Lewis (1996) uvádí hodnotu 14,5 % hrubého proteinu jako vhodnou pro odstavená hříbata ve věku 4-6 měsíců, která vyžadují proteinu nejvíce. Pro ostatní třídy koní by byl obsah NL v silážích 1-5 vysoký. Důležitější než celkové množství proteinu, je jeho kvalita (aminokyselinové složení). Obsah NL je v silážích ovlivněn mírou aktivity mikrobiálních a rostlinných enzymů, dobou zavadání píce, teplotou, rostlinným druhem a jeho stářím. Velmi vysoké hodnoty proteinu v píci by indikovaly pozdní použití dusíkatého hnojiva před sklizní.

Normativní obsah celkové vlákniny (CF) v travní siláži, který uvádí Pozdíšek a kol. (2008) by měl být 25,4 %. Obsah CF ve vzorcích se pohybuje od 23,53 % do 26,69 %. Hodnotě dle norem nejlépe vyhovuje vzorek č. 1 s obsahem 25,26 %. Množství vlákniny se zvyšuje se stářím porostu a ten se stává méně stravitelným. Lewis (1996) uvádí, že více než 34-40 % CF v krmné dávce koně má za následek vznik „senného břicha“ z důvodu nízké stravitelnosti a dostupnosti energie z krmiva. K hodnocení kvality krmiva parametr celkové vlákniny není dostačující. Důležitý je poměr jednotlivých frakcí vlákniny.

Kredatus (2011) uvádí optimální obsah NDF v rozmezí 40-50 % a dodává, že při obsahu nad 65 % koně píci již nepřijímají. Navíc při tak vysokém obsahu NDF hrozí vznik koliky. West (2008) publikuje, že vysoce kvalitní krmivo obsahuje NDF v rozmezí 35-55 %. Hodnoty NDF u analyzovaných vzorků se pohybují v rozmezí od 47,07 % do 52,04 %, což jsou hodnoty spíše vyšší a siláže lze považovat za horší kvality. McDonald (1981) a Jaakkola and Huhtanen (1993) se shodují, že v důsledku procesu silážování obsahují travní siláže nižší podíl NDF než seno. McDonald (1981) ještě dodává, že hemicelulóza je během silážování hydrolyzována. Nicméně hemicelulózy jsou pro koně jednoduše stravitelné. Z tohoto důvodu je významnějším měřítkem stravitelnosti obsah ADF. Jak uvádí Kredatus (2011), obsah ADF by se měl v krmivu koně pohybovat v rozmezí 30-35 %, krmivo s obsahem 45 % ADF má

již minimální nutriční hodnotu. West (2008) uvádí vyhovující hodnoty obsahu ADF nižší, v rozpětí 25-35 % a dodává, že zastoupení ADF v nekvalitním krmivu je 35-45 %. U námi analyzovaných vzorků se obsah ADF pohybuje v rozmezí 26,24-29,63 %, což jsou hodnoty nižší než publikované jinými autory. Udávaným hodnotám se nejvíce blíží vzorek č. 2 s 29,63 % ADF. Při nedostatečném obsahu vlákniny v krmné dávce hrozí, že ji kůň začne vyhledávat z jiných zdrojů (okusováním dřevěného hrazení či pojídáním vlastních faeces).

Stanovený obsah tuku se u vzorků travních siláží pohybuje od 1,89 % do 2,54 %. Nedostatek tuku v krmné dávce koně běžně nehrozí. Pokud ano, projeví se šupinatou kůží, matnou srstí a jejím vypadáváním, případně i problémy s reprodukcí. Dle Lewise (1996) problémy nastávají až při obsahu vyšším než 20-30 %. Takové krmivo koním většinou nechutná, případně způsobuje přebytek energie a obezitu. Pokud je u koní naopak nedostatečný příjem energie ze sacharidů a tuků, dochází ke katabolismu tělesných zásob bílkovin a následné zvýšené tvorbě močoviny a kreatinu. Vylučování těchto látek nadměrně zatěžuje játra a ledviny.

Při vysokém množství BNLV hrozí výskyt laminitid a vznik kolik. Obsah sacharidů v rostlinách začíná stoupat ráno a kulminuje po obědě. Podle Kredatuse (2011) by obsah škrobu a cukru v krmné dávce neměl přesáhnout 10 %. Jeho vysoký obsah je zejména nebezpečný pro koně trpících laminitidou, nebo Cushingovou chorobou. Cuddeford (200) dodává, že zdraví koně ohrožuje příjem vyšší než 0,4 % ž. hm. nestrukturálních sacharidů na jedno nakrmení. Hodnoty BNLV zjištěné ve vzorcích travních siláží se pohybují v rozmezí 46,88-48,10 %.

U stejných vzorků travních siláží byla stanovena *in vitro* stravitelnost dvěma různými inkubačními roztoky. Při stanovení stravitelnosti sušiny *in vitro* za použití pepsin-celulázového inkubačního roztoku byly zjištěny hodnoty v rozmezí 69,47 % - 79,06 % (Ø75,6 %). Tyto hodnoty jsou vyšší v porovnání s použitím inkubačního roztoku z koňských faeces, kde se stanovená stravitelnost pohybovala v rozmezí 48,77 % - 65,66 % (Ø58,85 %). Nejvyšší stravitelnost byla stanovena u vzorku č. 5 (79,06 %) za pomoci pepsin-celulázového roztoku. To se neshoduje se stanovením za pomoci inkubačního roztoku z faeces, kde byl s nejvyšší stravitelností stanoven vzorek č. 4 (65,66 %). Muhonen et al. (2009) na základě *in vivo* bilančních pokusů uvádí stravitelnost sušiny travní siláže 68 %. V porovnání s tímto jsou stanovené hodnoty stravitelnosti vyšší, nebo naopak nižší. Barchesi-Ferrari et al. (2011) ve své práci publikuje hodnotu stravitelnosti sušiny pomocí pepsin-celulázového inkubačního

roztoku 49 % při době inkubace 48 h. Tato hodnota je oproti našemu výsledku nižší a rovná se spíše stanovení za pomoci inkubačního roztoku z koňských faeces.

Hodnoty stravitelnosti organické hmoty se při použití pepsin-celulázového inkubačního roztoku pohybovaly v rozmezí 69,22 % - 76,31 % (Ø73,45 %). Při použití koňských faeces jako inkubačního roztoku byla stravitelnost nižší, a to v rozmezí 42,74 % – 59,05 % (Ø52,63 %). Nejvyšší stravitelnost byla stanovena u vzorku č. 3 (76,31 %) pomocí pepsin-celulázového inkubačního roztoku. Toto stanovení se neshoduje se stravitelností stanovenou za pomoci koňských faeces, kde byla nejvyšší stravitelnost u vzorku č. 4 (59,05 %). Forejtová a kol. (2005) uvádí průměrnou stravitelnost za použití pepsin-celulázového roztoku 65,9 % ($\pm 1,86$), což je hodnota nižší než námi zjištěná. Barchesi-Ferrari et al. (2011) udává stravitelnost 46,2 %.

Rozdíly stanovených hodnot stravitelnosti mohou být způsobeny rozdílnou druhovou skladbou vzorků, nebo rozdílnou velikostí částic stanovovaných vzorků. Míka a kol. (2009) ve své publikaci také uvádí, že tvar sáčků, ve kterých je vzorek inkubován, výrazně ovlivňuje pepsin-celulázovou rozpustnost. Bergero et al. (2002) a Loučka et al. (1998) publikují, že rozdílné hodnoty stravitelnosti mezi jednotlivými travními silážemi mohou být způsobeny sklizní v odlišných růstových fázích porostu, různou druhovou skladbou rostlin, proměnami počasí, uskladněním a fyzikální úpravou krmiv. Dalším významným vlivem je průběh výroby travní siláže – dokonalostí konzervace. Výsledky získané při použití pepsin-celulázového roztoku byly vyšší, důvodem může být vyšší koncentrace enzymů. V našem případě bylo pro přípravu inkubačního roztoku použito 200 g čerstvých koňských faeces, avšak žádná z doposud publikovaných studií neuvádí přesné množství faeces, které by mělo být k přípravě použito. Studii s tímto zaměřením prováděl Denek et al. (2008) pro pepsin-HCl metodu. Na základě výsledků pro stanovení stravitelnosti objemných krmiv doporučuje 250 g výkalů a 48 h inkubaci, nebo 660 g výkalů a 72 hodin inkubaci. Daniel et al. (1997) a Boisen and Fernandez (1991) se ve svých studiích shodují, že při stanovování *in vitro* stravitelnosti jsou vytvořeny ideální podmínky pro fermentaci a hodnoty takto stanovené budou vyšší.

Na základě provedených analýz vzorků ($n=15$) lze konstatovat, že mezi jednotlivými inkubačními roztoky se vyskytují značné rozdíly přesnosti stanovení. Nejvyšší variabilitu vykazují výsledky stanovené za pomoci inkubačního roztoku z koňských faeces. Pomocí *t*-Testu pro závislé vzorky byl vyhodnocen vliv *in vitro* stravitelnosti s ohledem na použitý inkubační roztok. Porovnány byly hodnoty DMD

s použitím roztoku z faeces vůči hodnotám DMD s použitím pepsin-celulázového roztoku. Stejným způsobem byla vyhodnocena stravitelnost organické hmoty (OMD). Výsledky byly ověřeny na hladině významnosti 0,05. Hodnota p je menší než 0,05. Z toho důvodu bylo vyhodnoceno, že výsledky testu potvrdili H_{1A} -inkubační roztoky ovlivňují získané hodnoty *in vitro* stanovení stravitelnosti vybraných živin travních siláží. To znamená, že některé inkubační roztoky poskytují přesnější hodnoty stanovení stravitelnosti. Další hypotéza (H_2) byla testována pomocí korelační a regresní analýzy. Analýzou byla hodnocena korelace zjištěných výsledků za použití prvního a druhého inkubačního roztoku. Hodnota $p < 0,05$ a byl zjištěn statisticky významný rozdíl (koeficient determinace a regresní koeficient je různý od 0). U OMD je korelační koeficient $r=0,75$, to značí silnou pozitivní závislost mezi sledovanými vzorky. U DMD je korelační koeficient $r=0,94$, to značí silnou pozitivní závislost mezi vzorky. Na základě silné pozitivní závislosti mezi vzorky lze určit, že při změně stanovené stravitelnosti se hodnoty obou stanovení posunují stejným směrem. Což znamená, že při snížení hodnoty stravitelnosti stanovené jedním roztokem se sníží i hodnota stravitelnosti stanovená druhým roztokem. Na základě silné závislosti přijímáme hypotézu H_{2A} . Korelační analýza zároveň prokázala přesnější vyhodnocení stravitelnosti sušiny, to může být způsobeno odchylkami, které vznikají při přepočtu hodnot na OM.

Závěr

Cílem práce bylo zjistit a porovnat variabilitu výsledků stanovení *in vitro* stravitelnosti vybraných živin travní siláže s využitím různých inkubačních roztoků. Použity byly dva inkubační roztoky. První inkubační roztok byl pepsin-celulázový, druhý byl vytvořen z koňských faeces.

Na základě stanovených hodnot stravitelnosti mělo dojít k vyvrácení, nebo potvrzení hypotézy (H1), že inkubační roztoky neovlivňují výsledky *in vitro* stanovení stravitelnosti vybraných živin v travní siláži. A potvrdit, nebo vyvrátit i druhou hypotézu (H2), že mezi inkubačními vzorky lze vybrat ty, které umožňují zpřesnit stanovení *in vitro* stravitelnosti živin.

Ověření hypotéz bylo provedeno srovnáním hodnot získaných stanovením *in vitro* stravitelnosti na přístroji ANKOM Daisy^{II} Inkubátoru za použití pepsin-celulázového inkubačního roztoku a roztoku z čerstvých koňských faeces. Zkoumaným krmivem byla travní siláž a zkoumanými živinami OM a sušina. Na základě provedených analýz byly zjištěny tyto závěry:

- mezi jednotlivými inkubačními roztoky se vyskytují značné rozdíly přesnosti stanovení hodnot *in vitro* stravitelnosti,
- mezi inkubačními roztoky byla zjištěna silná pozitivní korelace, způsobující vyhodnocení stravitelnosti stejným směrem, to značí, že roztoky působí stejně (degradují materiál),
- variabilita získaných výsledků byla poměrně vysoká, a to především v případě použití faeces jako zdroje inkulantu
- stravitelnost stanovená *in vitro* v pepsin-celulázovém inkubačním roztoku poskytuje vyšší hodnoty,
- stanovené hodnoty stravitelnosti sušiny byly přesnější oproti hodnotám stravitelnosti OM,
- množství použitých faeces a doba inkubace ovlivňuje výsledky stanovení stravitelnosti, bylo by dobré se v pozdějších experimentech zaměřit na zpřesnění stravitelnosti s ohledem na množství použitých faeces a dobu inkubace,
- mezi jednotlivými publikacemi se vyskytují velké rozdíly získaných hodnot stanovených pomocí pepsin-celulázového roztoku a roztoku z faeces,

Seznam literatury

Alexander R. H., McGowan M. 1966. In: Boila R. J., Erfle J. D., Sauer F. D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the in vitro estimation of the dry matter digestibility of corn silage. Can. J. Anim. Sci. Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p. 367–378.

Auer J. A., Stick, J. A. 2006. Equine surgery. Third edition. Elsevier Inc. St. Louis. 1455p. ISBN: 978-1-4160-0123-2.

Barchiesi-Ferrari C., Alomar D., Miranda H. 2011. Pepsin-cellulase digestibility of pasture silages: Effects of pasture type, maturity stage, and variations in the enzymatic method. Ch. J. of Agricult. Res. Vol. 71 (2). p249-257.

Bentz B. G. 2014. Anatomy of the Equine intestinal Tract [online]. The Horse. 8th January 2014. [cit. 2016-08-11]. Dostupné z <
<http://www.thehorse.com/articles/33170/anatomy-of-the-equine-intestinal-tract>>

Bergero D., Peiretti P. G., Cola E. 2002. Intake and apparent digestibility of perennial ryegrass haylages fed to ponies either at maintenance or at work. Elsevier. Vol. 77 (2-3). Pub. November 2002. p325-329

Bezděková B., Jahn P. 2003. Gastroduodenální ulcerace u koní. Veterinářství. č53. s280-284.

Boila R. J., Erfle J. D., Sauer F. D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the in vitro estimation of the dry matter digestibility of corn silage. Can. J. Anim. Sci. Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p367– 78.

Boisen S., Fernandez J. A. 1991. In vitro digestibility of energy and amino acids in pig feeds. In: Verstegen M. W. A., Huísman J., Hartog L. A. Proceedings of the Vth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs. European Federation of Animal Science. Netherlands.

Costa M. C., Arroyo L. G., Allen-Vercoe E., Stampfli H. R., Kim R. T., Sturgeon A., Scott Weese J. 2012. Comparasion of the fecal microbiota of healthy horses and

horses with colitis by high throughput sequencing of the v3-v5 region of the 16S rRNA gene. PLoS ONE. Vol. 7. Doi:10.1371/journal.pone.0041484

Cuddeford D. 2000. Starch digestion in the horse. *Advances in Equine Nutrition* Vol. II. Kentucky Equine Research, p95–104.

Daniel M. E., Rave G., Feldheim W. 1997. Fermentation in human subjects of nonstarch polysaccharides in mixed diets, but not in a barely fiber concentrate, could be predicted by *in vitro* fermentation using human fecal inocula. *J. Nutr.* Vol. 127 (10). p1981-1988.

DeFombelle A., Veiga L., Drogoul C., Julliand V. 2004. Effect of diet composition and feeding pattern on the prececal digestibility of starches from botanical origins measured with the mobile nylon bag technique in horses. *J. Anim. Sci.*, Vol. 82. p3625–3634.

Denek N., Polat E., Koncagul S., Can A. 2008. The determination of incubation time and amount of faecal content of horse faeces as an inoculum source for digestibility determination of forages with *in vitro* procedure. *J. Anim. Vet. Adv.* Vol. 7 (6). p698-702.

Dihehuis F., Elfering, S. J. W. H. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *The veterinary quarterly.* 22 (4). 212-216.

Earing J. E., Cassill B. D., Hayes S. H., Vanzant E. S., Lawrence L. M. 2010. Comparison of *in vitro* digestibility estimates using the DaisyII incubator with *in vivo* digestibility estimates in horses. *J. Anim. Sci.*, 88: 3954–3963.

Frape D. 2004. *Equine nutrition and feeding.* Third edition. Blackwell Publishing. Oxford. 560p. ISBN: 1-4051-0598-4.

Goering H. K., Van Soest P. J. 1970. In: Boila R. J., Erfle J. D., Sauer F. D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the *in vitro* estimation of the dry matter digestibility of corn silage. *Can. J. Anim. Sci.* Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p. 367 – 378.

Goachet A.G., Harris P., phillipeau C. Julliard V. 2014. Effect of physical training on nutrient digestibility and faecal fermentative parameters in Standardbred horses. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. Doi:10.1111/jpn.12177.

Grant R. J., Van Soest P. J., McDowell R. E. 1974. In: Boila R. J., Erfle J. D., Sauer F. D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the *in vitro* estimation of the dry matter digestibility of corn silage. Can. J. Anim. Sci. Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p. 367–378.

Gruber L., Schauer A., Häusler J., Urdl M., Adelwöhrer A, Südekum K. H. 2011. Influence of growth stage of permanent grassland on dry matter yield, nutritive value, feed intake and milk yield of dairy cows during the whole period of vegetation. Grassland Science in Europe. Vol. 16. p136-138.

Hejduk S., Buchgraber K., Pozdíšek J. 2013. Hodnocení píče trvalých travních porostů pro dojnice. AgroDigest s.r.o. Pohořelice. 592s. ISBN 978-80-260-2514-6.

Hendriks A. T. W., M. Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. Vol. 100(1), p10-18. ISSN 09608524.

Hopkins A., Wilkins R. J. 2006. Temperate grassland: key developments in the last century and future perspectives. The Journal of Agriculture Science. Vol. 144. p503-523.

Jančík F., Homolka P., Koukolová V. 2009. Stanovení parametrů degradovatelnosti a stravitelnosti sušiny a vlákniny trav na základě chemického složení. VÚZV, Praha Uhřetěves. Praha. 32s. ISBN 978-80-7403-029-1.

Jaakkola S., Huhtanen P. 1993. The effects of forage preservation method and proportion of concentrate on nitrogen digestion and rumen fermentation in cattle. Grass forage science. Vol. 48 (2).

Johnson R. R. 1966. In: Boila R. J., Erfle J. D., Sauer F. D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the *in vitro* estimation of the dry matter digestibility of corn silage. Can. J. Anim. Sci. Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p. 367 – 378.

Julliard V. 1998. Ecologie microbienne du système digestif des équidés. Journée Recherche Equine. Paris. Published 4th March. p 105-114.

Khan M. A., Nisa un M., Sarwar M. 2003. Techniques measuring Digestibility for the Nutritional Evaluation of Feeds. International Journal of Agriculture and Biology. Vol. 5 (1). p 91-94.

Lattimer J. M., Cooper S. R., Freeman D. W. Lalman D. L. 2007. Effect of yeast culture on in vitro fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculums in a Daisy^{II} incubator. J. Anim. Sci. Vol. 85. p2484-2491.

Lewis L. D. 1996. Feeding and care of the Horse. 2nd Edition. Wiley-Blackwell. USA. p400. ISBN 978-0-683-04967-1

López S., Carro M. D., González J. S., Ovejero F. J. 1998. Comparison of different in vitro and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. Anim. Feed. Sci. Technol. 73, p99-113.

Lingvall P. 2006. Výroba kvalitních siláží ke krmení koní. 12. Mezinárodní sympozium konzervace objemných krmiv. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN: 80-7305-555-4.

Lowman R. S., Theodorou M. K., Hyslop J. J., Dhanoa M. S., Cuddeford D. 1999. evaluation of an in vitro batch culture technique for estimating the in vivo digestibility and digestible energy content of equine feeds using equine faeces as the source of microbial inoculum. Anim. Feed. Sci. Technol. Vol. 80. p11-27

Kienzle E. 1994. Small intestinal digestion of starch in the horse. Rev. Med. Vet. Vol. 145. p199–204.

Knipfel J. E., Troelsen J. E. 1966. In: Boila R. J., Erfle J. D., Sauer F. D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the in vitro estimation of the dry matter digestibility of corn silage. Can. J. Anim. Sci. Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p. 367–378.

Knudsen K. E. B. 2016. Fibre's role in animal nutrition and intestinal health. All about feed. Pub. 17-10-2016 [cit. 20-02-2017]. Dostupné z

<<http://www.allaboutfeed.net/Feed-Additives/Articles/2016/10/Fibres-role-in-animal-nutrition-and-intestinal-health-2898069W/?dossier=24685&widgetid=1>>

Kredatus Š. 2010. Základy výživy koní. Slovenský chov. č. 3. s 38-40.

Mackie R. I., Wilkins C. A. 1988. Enumeration of anaerobic bacterial mikroflóra of the equine gastrointestinal tract. Applied Environmental Microbiology. Vol. 54. p2155.

Marvan F., Hampl A., Hložánková E., Kresan J., Massanyi L., Vernerová E. 2007. Morfologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 304s. ISBN: 978-80-213-1658-4.

McDonald P. 1981. The biochemistry of silage. John Wiley and Sons. UK. p226. ISBN 0471279655

McDonald P. 2002. In: Saastamoinen M., Fradinho M. J., Santos A. S., Miraglia N. 2012. Forages and grazing in horse nutrition. EAAP Scientific series. Vol. 132. p512. eISBN 978-90-8686-755-4

McDonald P., Greenhalgh J. F. D., Morgan C. A., Edwards R., Sinclair L. 2011. Animal nutrition. Seventh edition. Pearson. 712p. ISBN13: 9781408204238.

McLeod M. N., Minson D. J. 1969. In: Boila R. J., Erfle J. D., Sauer F. D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the in vitro estimation of the dry matter digestibility of corn silage. Can. J. Anim. Sci. Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p. 367–378.

Míka V., Paul Ch., Zimmer E., Kaufmann W. 1982. Stanovení stravitelnosti objemných krmiv. Živočišná výroba. č. 27. s409-416.

Míka V., Paul Ch. 1985. Sezónní variabilita ukazatelů výživné hodnoty části rostliny píce trav a jetelovin. Rostlinná výroba. č. 31. s653-662.

Míka V. 1997. Kvalita píce. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha. 227s.

Míka V., Kohoutek A., Pozdíšek J., Němcová P. 2009. Stanovení ELOS (enzymaticky rozpustné organické hmoty) v píci s využitím tuzemských celuláz

z *Trichoderma reesei*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. Praha. 30s. ISBN 978-80-87011-54-6

Muhonen S., Lindberg J. E., Bertilsson J., Jansson A. 2009. Effect on fluid balance, digestion and exercise response in standardbred horses fed silage, haylage and hay. *Comparative Exercise Physiology*. Vol. 5 (3-4). p133-142.

Najbrt R. 1980. Veterinární anatomie 1. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 524s. ISBN: 07-097-80.

Nelson B. D., Ellzey H. D., Montgomery C. Morgan E. B. 1972. In: Boila R. J., Erfle J. D., Sauer F. D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the in vitro estimation of the dry matter digestibility of corn silage. *Can. J. Anim. Sci.* Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p. 367–378.

National Research Council. 2007. Nutrient Requirements of Horses: Sixth Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press. p. 360. ISBN: 978-0-309-10212-4.

Micek P., Kowalski Z. M., Borowiec F., Shelford J. A. 2001. Digestibility of whole grain crop silages determined by different methods. *Journal of Animal Feed Sciences*. 10. 695–706.

Pagan J. D. 1998. Carbohydrates in equine nutrition. *Advances in Equine Nutrition*. Nottingham University Press. Nottingham, UK. p 29-41.

Penning P. D., Johnson R. H. 2009. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake: 1. Potentially indigestible cellulose and acid insoluble ash. *The Journal of Agricultural Science*. Vol. 100 (1). p127-131

Potter G. D., Arnold F. F., Householder D. D., Hansen D. H., Brown K. M. 1992. Digestion of starch in the small or large intestine of the equine. *Pferdeheilkunde, Sonderheft*, p107–111.

Pötsche E. M., Resch R. 2005. Einfluss unterschiedlicher Bewirtschaftungsmassnahmen auf den Nährstoffgehalt von Grünlandfutter. 32th Viehwirtschaftliche Fachtagung, HBLFA, Raumberg-Gumpenstein. p15.

- Reece W. O.** 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada Publishing. Praha. 480s. ISBN: 978-80-247-3282-4.
- Reynolds J. A.** 2004. Equine Nutrition in the 21st Century [online]. Equisearch. 24th October 2002. [cit. 2016-10-10]. Dostupné z <<http://www.equisearch.com/article/eqdigestio3120>>
- Roe M. B., Chase L. E., Sniffen J.** 1991. Comparasion of in vitro techniques to the in situ technique for estimation of ruminal degradation of protein. Journal of Dairy Science. 74. 1632–1640.
- Saastamoinen M., Fradinho M. J., Santos A. S., Miraglia N.** 2012. Forages and grazing in horse nutrition. EAAP Scientific series. Vol. 132. p512. eISBN 978-90-8686-755-4
- Santos A. S. S., Rodrigues M. A. M., Bessa R., Ferreira L., Martin-Rosset W.** 2011. Understanding the equine cecum-colon ekosystém: Current knowledge and future perspectives. Animal. 5:1. p 48-56.
- Sayre K. D., Van Soest P. J.** 1972. In: Boila, R., J., Erfle, J., D., Sauer, F., D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the in vitro estimation of the dry matter digestibility of corn silage. Can. J. Anim. Sci. Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p. 367–378.
- Seeliger H. P. R., Jones D.** 1986. Listeria. In: Dongyou, L. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. Journal of Medical Microbiology. Vol. 55. p 645-659.
- Sneddon J. C., Argenizo R. A.** 1998. Feeding strátégý and water homeostasis in equids: the role of the hind gut. J. Arid Environ. Vol. 38. p 493-509.
- Švehlová D.** Jak funguje kůň Část 36.: Trávení a vstřebávání [online]. 2010. [cit.03-04-2017]. Dostupné z < <http://www.ifauna.cz/kone/clanky/r/detail/5274/jak-funguje-kun-cast-36-traveni-a-vstrebavani>>
- Tilley J. M. A., Terry R. A.** 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Brit. Grassland Soc. Vol. 18. p104–111.

Troelsen J. E., Hanel D. J. 1966. In: Boila, R., J., Erfle, J., D., Sauer, F., D. 1980. Evaluation of the Two-Stage technique for the in vitro estimation of the dry matter digestibility of corn silage. Can. J. Anim. Sci. Published 3 November 1980 [cit. 06-01-2017]. 60. p. 367–378.

Van Soest P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press. 476 p. ISBN: 9780801427725.

Weisbjerg M. 2007. Organic matter digestibility – Methods used in the Nordic countries. Nordic feed evaluation systém. p3.

West Ch. M. 2008. Fiber in Hay: What's the Magic Number? The Horse. Pub May 1, 2008 [cit.07-04-2017].

Virkjärvi P., Saarijärvi K., Rinne M., Saastamoinen M. 2013. Grass physiology and its relation to nutritive value in feeding horses. In: Saastamoinen, M., Fradinho, M., J., Santos, A., S., Miraglia, N. 2012. Forage and grazing in horse nutrition. Wageningen Academic Publishers. Ntherlands. 511p. ISBN: 978-90-8686-200-9

Williams C. A. 2012. The Basics of Equine Nutrition [online]. My horse university. September 2012. [cit. 09-12-2016]. Dostupné z <<http://www.myhorseuniversity.com/EE/September2012/Nutrition>>

Wilkinson J. M. 1999. Silage and animal health. Natural toxins. Vol 7. Issue 6. p 221-421.

Wilkins R. J. 2005. Silage: A global Prespective. In: Reynolds, S., G., Frame, J. 2005. Grasslands: Developments Opportunities Perspectives. Science Publishers, Inc. Enfiled, New Hampshire, USA. 541p. ISBN: 1-57808-359-1

Zeman L. 2006. Výživa a krmení hospodářských zvířat. Profi press. Praha. 360 s. ISBN: 80-86726-17-

Zeman L. 2008. In: Zeman L., Tvrzník P, Herzig I. 2008. Úvod do problematiky vztahu výživy a zdravotního stavu zvířat. VÚZV, Praha – Uhřetěves. 59s.

Seznam použitých zkratek a symbolů

ADF – acido detergentní vláknina (frakce vlákniny rozpustné v kyselém detergentu)

BNLV – bezdusíkaté látky výtažkové

CF – hrubá vláknina

DM – „dry matter“, sušina

DMD – „dry matter degradability“, degradovatelnost sušiny

EDTA – zkratka používaná pro kyselinu ethylendiamintetraoctovou a její soli

In sacco – *in vivo* metoda, provádí se v sáčcích, které jsou umístěny v trávicím traktu zvířete

In situ – metodika, která probíhá v původních podmínkách

In vitro – v laboratorních podmínkách

In vivo – na živém organismu

NDF – neutrálně detergentní vláknina (frakce vlákniny rozpustné v neutrálním detergentu)

NL – dusíkaté látky

OM – „organic matter“, organická hmota

OMD – „organic matter degradability“, stravitelnost organické hmoty

Přílohy

Příloha 1 Schéma chemického složení krmiva

Sušina	N-látky		bílkoviny	aminokyseliny	Lys, Met, Thr, Trp
			Nebílkovinné látky	Močovina	
	lipidy		Tuky	k. linolová	
			Vosky		
			Jiné		
	Sacharidy	Vláknina	Celulóza	Hexózy	
			Hemicelulóza	Pentózy	
			Lignin		
		BNLV	Polysacharidy	Škroby	
	Monosacharidy		Cukry		
	Popeloviny		Makroprvky	Ca, P, Na, K, S, Mg, Cl	
			Stopové prvky	Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Se, I	

Zeman (2006)

Obrázek 6 Sáčky F57 ke stanovení CF, NDF a ADF (vlevo); vzorky travní siláže se stanovenou sušinou



Obrázek 7 Vzorky po stanovení CF a louhování v acetonu (vlevo); ANKOM200 fibre analyzer (vpravo)



Obrázek 8 Mineralizační tuby (vlevo); přístroj Kjeltect™ 2400 Auto Analyzer (vpravo)



Obrázek 9 Příprava vzorků k *in vitro* stanovení stravitelnosti (vlevo i vpravo)

