

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská



Diplomová práce

Praha 2011

Bc. Jan Sajdl

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a myslivosti



Diplomová práce

Aktivita hydrolytických enzymů v bachoru srnčí
zvěře v polních oblastech Mladoboleslavska

Vedoucí práce: Ing. Petra Nováková, Ph.D.

Praha 2011

Vypracoval:

Bc. Jan Sajdl

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Aktivita hydrolytických enzymů v bachoru srnčí zvěře v polních oblastech Mladoboleslava“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

dne

podpis

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Katedra ochrany lesa a myslivosti

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Sajdl Jan

Lesní inženýrství

Název práce

Aktivita hydrolytických enzymů v bachoru srnčí zvěře v polních oblastech Mladoboleslavka

Anglický název

The activity of hydrolytic enzymes in roe deer rumen in the field areas of Mladá Boleslav (Central Bohemia, Czech Republic)

Cíle práce

Cílem práce je zhodnocení aktivity hydrolytických enzymů v bachorech srnčí zvěře v polních oblastech na Mladoboleslavsku.

Metodika

V práci se zaměříte zejména na zpracování přehledu o současné úrovni poznání řešeného tématu, podrobnou charakteristiku oblasti, význam a zhodnocení aktivity hydrolytických enzymů v bachoru srnčí zvěře, vyslovení závěru a doporučení pro mysliveckou praxi.

Harmonogram zpracování

Vytištěný strukturovaný rukopis diplomové práce předložte do 30.4.2011. Při zpracování práce vycházejte z pokynů uvedených na adrese <https://moodle.czu.cz/course/category.php?id=45>

Rozsah textové části

cca 50 stran

Klíčová slova

hydrolytické enzymy, srnčí zvěř, bachor, Mladá Boleslav, Česká republika

Doporučené zdroje informací

Chesson A., 1993: Feed Enzymes. Anim. Sci. Feed Technol. 45, 65-79.

Eisenthal, R., Danson, M.J. (Eds) 2002: Enzyme Assays. A Practical Approach. Oxford University Press, Inc., New York, 282 pp.

Šimůnek J., Skřivanová V., Hoza I., Březina P., Marounek M., 1995: Ontogenesis of enzymatic activities in the gastrointestinal tract of young goats. Small Ruminant Research 17, 207-211.

Van Soest, P.J. 1982: Ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fibres in Nutritional Ecology of the Ruminants. Published by O. and B. Books Inc., USA.

Van Soest, P.J. 1983: Nutritional Ecology of the Ruminants. Published by O. and B. Books Inc., USA., 374 pp.

Vedoucí práce

Nováková Petra, Ing., Ph.D.

Konzultant práce

MVDr. Jiří Šimůnek, CSc.

Termín SZZ

2011/06 (červen)



Petra Nováková

Vedoucí katedry

Jiří Šimůnek

Děkan fakulty

V Praze dne 18.1.2011

Velmi rád bych poděkoval vedoucí své diplomové práce Ing. Petře Novákové, Ph.D. za její odborné vedení. Dále bych rád poděkoval MVDr. Jiřímu Šimůnkovi, CSc., Ing. Haně Bartoňové a Ing. Ingrid Koppové, Ph.D. za poskytování cenných rad, vstřícnou pomoc, vhodné připomínky a čas, který mi věnovali. Chtěl bych také poděkovat přátelům myslivcům, své rodině a blízkým za podporu a trpělivost.

Abstrakt

Nutriční strategie přežvýkavců je založena na fermentaci rostlinné potravy probíhající prostřednictvím mikrobiálního ekosystému osídlujícího bacher. Populace mikroorganismů produkují řadu enzymů účastnících se degradace jednotlivých složek potravy, jež by jinak byly pro hostitelský organismus nevyužitelné.

Předložená práce popisuje aktivity vybraných hydrolytických enzymů srnčí zvěře ve vzorcích bacherového obsahu odebraného ve třech lokalitách Mladoboleslavska lišících se celkovou charakteristikou území, charakteristikou území a dostupností potravy. Schopnost bacherové fermentace účinně degradovat různé strukturní a zásobní polysacharidy obsažené v krmivech byla ověřována porovnáním aktivity celulózy, celobiohydrolázy, endoglukanázy, β -glukosidázy, pektinázy, xylanázy, chitinázy, N-acetylglukosaminidázy, amylázy, inulinázy, proteázy a lipázy. Metodou zymografie v systému PAGE pro jednotlivé enzymové aktivity byla prokázána přítomnost izoenzymů. Vysoká aktivita enzymů podílejících se na degradaci celulózy (endoglukanázy, celobiohydrolázy a β glukosidázy) byla zaznamenána ve vzorcích z lokality Bradlec, kde byly rovněž nápadně vyšší aktivity pektinolytických enzymů. Levobřežní oblast Jizery byla charakteristická zvýšenou aktivitou chitinolytických, lipolytických a proteolytických enzymů, pravobřežní naopak pektinolytickou aktivitou.

Ve všech oblastech byla detekována aktivita ověřovaných hydroláz, jednotlivé lokality se aktivitou enzymů značně lišily, obecně vyšší hodnoty byly naměřeny v lokalitě Bradlec pravděpodobně s ohledem na strukturu krajiny poskytující pestrou nabídku vhodné potravy a způsob přikrmování srnčí zvěře v této lokalitě.

Klíčová slova: Hydrolytické enzymy, bacherová fermentace, srnčí zvěř, Mladá Boleslav, Česká republika

Abstract

Nutritional strategies of ruminants are based on the fermentation of plant foods by acting of the rumen microbial ecosystem. The population of micro-organisms produces wide spectrum of enzymes involved in degradation of food components that would be otherwise unusable by the host organism.

The present work describes the activities of selected hydrolytic enzymes in the roe deer rumen content samples collected in three areas in Mladá Boleslav district with different general characteristics, landscape characteristics and food availability. The ability of rumen fermentation effectively degrade the various structural and storage polysaccharides contained in the feed was investigated by comparing the activities of cellobiohydrolase, endoglucanase, β -glucosidase pectinase, xylanase, chitinase, N-acetylglucosaminidase, amylase, inulinase, protease and lipase. The active isoenzymes were detected by zymography. High activities of enzymes involved in cellulose degradation (endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase) was observed in samples collected in Bradlec, which showed also markedly higher pectinolytic activity. Samples collected on the left bank of the Jizera river were characterized by increased chitinolytic, lipolytic and proteolytic activities, contrary to that pectinolytic activity was higher on the right bank of the river.

According to our findings, samples collected in all areas showed significant activities of tested hydrolases. Markedly higher values were measured in the area Bradlec. That fact can be explained in terms of the landscape properties providing a wide range of appropriate food and care on roe deer feeding in this area.

Keywords: Hydrolytic enzymes, rumen fermentation, roe deer, Mlada Boleslav, the Czech Republic

Obsah

Obsah	9
Úvod.....	11
1. Cíl práce	12
2. Literární přehled	13
2.1 Úvod.....	13
2.2 Výživa srnčí zvěře	13
2.3 Anatomie a fyziologie trávicího traktu srnce obecného	16
<i>Uspořádání a stavba předžaludku srnčí zvěře.....</i>	18
<i>Motorická činnost předžaludku srnčí zvěře</i>	19
2.4 Mikroflóra a mikrofauna bachoru	20
2.5 Účast hydrolytických enzymů v bachorové fermentaci.....	23
2.5.1 Celulolytické enzymy	24
<i>Endoglukanáza (EC 3.2.1.4).....</i>	25
<i>Celobiohydroláza (EC 3.2.1.91).....</i>	26
<i>β-glukosidáza (EC 3.2.1.21)</i>	26
2.5.2 Chitinolytické enzymy	26
<i>Chitináza (EC 3.2.1.14)</i>	27
<i>N-acetylglukosaminidáza (EC 3.2.1.50).....</i>	27
2.5.3 Pektinolytické enzymy.....	27
<i>Pektináza (EC 3.2.1.15).....</i>	28
2.5.4 Xylanolytické enzymy	28
<i>Xylanáza (EC 3.2.1.8).....</i>	29
2.5.5 Enzymy štěpící zásobní polysacharidy	29
<i>A-amyláza (EC 3.2.1.1).....</i>	30
<i>Inulináza (EC 3.2.1.7).....</i>	30
2.5.6 Lipolytické enzymy	31
<i>Lipáza (EC 3.1.1.3).....</i>	31
2.5.7 Proteolytické enzymy	32
<i>Proteáza (EC 3.4.21.64)</i>	32
3. Materiál a metody	33
3.1 Použité chemikálie:.....	33

3.2 Laboratorní přístroje:	33
3.3 Charakteristika lokalit, odběr a zpracování vzorků	34
3.3.1 Lokalita A	35
3.3.2 Lokalita B	37
3.3.3 Lokalita C	39
3.3.4 Odběr vzorků:	40
3.3.5 Zpracování vzorků	43
3.4 Použité roztoky:	43
3.5 Analytické metody:	44
3.5.1 Stanovení proteinů	44
3.5.2 Stanovení aktivity enzymů celulózy, xylanázy, fruktunázy, pektinázy, amylázy, chitinázy	44
3.5.3 Stanovení proteázové aktivity	45
3.5.4 Stanovení aktivity β -glukosidázy) a N-acetylglukosaminidázy	46
3.5.5 Stanovení aktivity celobiohydrolazy	46
3.5.6 Stanovení lipázy miskovou metodou	47
3.6 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	47
3.6.1 Zymografie	49
3.7 Statistické vyhodnocení	50
4. Výsledky	51
4.1 Aktivita hydrolytických enzymů v bachoru srnčí zvěře	51
4.1.1 Aktivita enzymů účastnících se degradace celulózy:	51
4.1.2 Aktivita chitinolytických enzymů	53
4.1.3 Aktivita pektinázy	55
4.1.4 Aktivita xylanázy	57
4.1.5 Aktivita amylázy a inulinázy	58
4.1.6 Aktivita lipázy	62
4.1.7 Aktivita proteázy	63
5. Diskuze	65
6. Závěr	67
7. Literatura	68

Úvod

Nejrozšířenější spárkatou zvěří v České republice je srnčí zvěř. Srnec obecný (*Capreolus capreolus*, Linnaeus 1758) se vyskytuje téměř na celém jejím území - ve všech nadmořských výškách, v lesích, v krajině intenzivně zemědělsky využívané a v posledních letech i v okrajových částech velkých měst.

Srnčí zvěř se těší značné pozornosti myslivecké i laické veřejnosti. Je proto velmi žádané věnovat pozornost zdravotnímu a výživnému stavu odrážejícímu kvalitu životního prostředí, zejména potravní nabídky.

Srnčí zvěř patří mezi přežvýkavce. Její trávicí trakt je výjimečný tím, že jeho součástí je tříkomorový předžaludek. V této objemné výduti trávicí trubice probíhá díky mnoha různým mikroorganismům (houby, bakterie a prvoci) významná část zpracování potravy, tzv. pregrastická fermentace. Tyto mikroorganismy působí na přijatou potravní hmotu mechanicky postupným rozmělněním rostlinných pletiv, především však produkcí velké množství různých enzymů nebo jiných látek významných pro další průběh fermentačních procesů (FLINT 1997). Nejvýznamnější třídou enzymů podílející se na štěpení především rostlinných složek potravy jsou hydrolázy (endoglukanáza, celobiohydrolasa, β -glukosidáza, amyláza, xylanáza, lipáza, proteáza, pektináza, chitináza, fruktanáza, N-acetylglukosaminidáza).

Enzymy jsou produkovány přirozeně všemi živými organismy od jednobuněčných až po vyšší živočichy. S enzymy se setkáváme nejen při trávicích pochodech, ale i v běžném životě, kdy se uplatňují např. v potravinářském průmyslu, kde je člověk využívá při výrobě vína, sýrů nebo při zpracování masa, v lékařství při léčbě a především diagnostice, v biochemii, nezastupitelné je jejich využití v rámci různých biotechnologií, z biologického pohledu představují jedny z nejvýznamnějších působků podmiňujících existenci a funkčnost živé hmoty jako takové jednak ve své funkci katalycké ale i regulační. Pro naplnění cílů této práce bude pozornost omezena na vybrané hydrolytické enzymy podílející se při bachorové fermentaci u srnčí zvěře žijících v odlišných podmínkách prostředí, zejména potravních zdrojů a může tak vypovídat o rozdílné úrovni chovatelských podmínek, zejména výživy a potravy, kterou zvěř má k dispozici.

1. Cíl práce

Práce je zaměřena na stanovení aktivit hydrolytických enzymů v bachorovém obsahu srnčí zvěře ulovené v různých lokalitách v polních oblastech Mladoboleslava lišících se charakteristikou území, dostupností některých složek potravy. Cílem této práce je stanovit úroveň aktivity těchto hydroláz a porovnat spektrum izoenzymů jako významného parametru úrovně bachorové fermentace.

2. Literární přehled

2.1 Úvod

Srnec obecný (*Capreolus capreolus*, LINNAEUS 1758) je naší původní zvěř. Ve velkém počtu obývá téměř celou Evropu vyjma severu Skandinávie, Islandu a Irska. V České republice je nejhojněji zastoupeným sudokopytníkem, jeho početnost je odhadována na zhruba 300 000 kusů. Patří do třídy savci (*Mammalia*), řádu sudokopytníci (*Artiodactyla*), čeledi jelenovití (*Cervidae*). Je to nejmenší evropský zástupce jelenovitých. Dorůstá výšky až 90 cm v kohoutku. Hmotnost je proměnlivá, podle prostředí a početnosti populace může dosahovat až 35 kg. Podle typu přijímané potravy řadíme srnce mezi býložravce, podle zpracovávání potravy mezi přežvýkavce (ČERVENÝ A KOL. 2004). Srnčí zvěř byla vždy vázaná na lesostepní krajinu, kde využívala veškeré potravní nabídky na lukách, okrajích lesů, kde se vždy vyskytovaly měkké dřeviny jako např. vrba jíva a tvrdé dřeviny jako např. buk lesní, habr obecný a dub letní (VACH 1993). V dnešní době se zdržuje převážně v lesích, žije ale také ve velkých lánech zemědělských monokultur, odkud je nucena migrovat do lesních a keřových porostů, hlavně za účelem zpestření potravní nabídky (ZABLODIL; KORHON 2010).

2.2 Výživa srnčí zvěře

Díky stavbě trávicí soustavy má srnčí zvěř možnost zpracovávat balastní a těžce stravitelnou rostlinnou potravu (KAMLER 2009). Má polyfázickou denní aktivitu (HANZAL A KOL. 2005), příjem potravy probíhá denně v osmi až dvanácti periodách. Počet pastevních period odpovídá počtu cyklů přežvykávání (VACH 1993). Polní srnčí zvěř má vyšší denní aktivitu ve srovnání se zvěř z lesnatého prostředí (HANZAL A KOL. 2005). Z potravního hlediska patří srnčí zvěř mezi tzv. okusovače a specializuje se převážně na potravu, která je složena z bylin, letorostů, větviček a pupenů různých druhů dřevin. Základní skladba potravy dle ročních období je uvedena v tabulce I. (VACH 1993 IN DRMOTA A KOL. 2007).

Tab. I.: Potravní složení srnčí zvěře dle ročního období (v procentech)

Období	Dřeviny	Byliny (kromě travin)	Traviny	Houby
Jaro	57	39	4	ojediněle
Léto	65	15	17	3
Podzim	47	39	14	-
Zima	63	24	13	-

Vhodným doplňkem potravy jsou jadrná krmiva. Ta, pokud jsou podávána ve správný čas (od konce léta po dobu zhruba 6 měsíců), zajišťují dostatečné vytvoření zásob tuku až o hmotnosti 3 kg. S tímto deponovaným tukem má zvěř větší šanci přečkat zimní období. Vhodné je podávat souběžně s jadrnými krmivy také minerální doplňky (4% koncentrace v krmivu), které vytvoří dostatečné zásoby vápníku pro parožení a pro podporu růstu kostry mladé zvěře. Součástí minerálního krmiva jsou další minerální prvky (fosfor, sodík, hořčík) a stopové prvky (měď, mangan, zinek, jód, kobalt, selen), které jsou důležité pro optimální vývoj (např. pro podporu vývoje plodu, tvorbu kvalitního mleziva a mléka u srn, kladení silných srnčat a jejich postnatální vývoj). Součástí minerálních doplňků jsou vitamino-minerální preparáty obsahující vitamíny především A, D3 a E, které jsou faktory nezbytnými pro růst a metabolismus. Správná aplikace minerálních doplňků v krmivu plnohodnotně doplňuje srnčí zvěři komponenty diety, které jsou v krmivech s ohledem na jejich kvalitu a složení půdy často obsaženy v nedostatečném množství. Denní dávka jadrného krmiva s minerálním doplňkem by měla představovat přibližně 0,25 kg.ks⁻¹ srnčí zvěře (BABIČKA A KOL. 2008).

Vlivem nedokonalého využití potravy a zhoršení výživy zvěře dochází k narušení trávicích procesů v trávicím traktu a hrozí, že dojde k různým poruchám trávicích funkcí. Při nadměrném požití jadrného krmiva a zejména při nedostatku hrubé vlákniny dochází k nadměrné tvorbě kyselin, zejména kyseliny mléčné a následně k tzv. bachorové acidóze (překyselení), projevující se různě vážným narušením celkového zdravotního stavu. Neodborný způsob přikrmování nerespektující fyziologické potřeby srnčí zvěře tak může vést často k závažným důsledkům. V přírodě se přirozená potrava mění výrazně jen při porovnání letního a zimního období, ale tento přechod probíhá pozvolna. Ve volné přírodě dochází k poruchám pouze v jarním období, kdy vyraší nová vegetace a v letním, kdy se zvěř pase na polích s obilninami. Každý kus zvěře by měl mít možnost se aspoň jednou

denně dostat k jednotlivé složce potravy. Pokud je přísun jednotlivých významných potravních komponentů omezen, dochází i ke změně složení mikroorganismů v bacheru a tím charakteru fermentačního procesu.

Potravní nabídku zásadním způsobem ovlivňuje především způsob zemědělského využití krajiny, zejména pak osevní postup a skladba pěstovaných plodin. V zimním období je pro srnčí zvěř velice atraktivní dvounulová řepka olejka, která má však negativní vliv na její organismus. Po větším požití mladých řepkových lístků obsahujících nadměrné množství dusíkatých látek a velmi malý podíl strukturní vlákniny dochází ke dvěma na sobě nezávislým procesům. První proces se projevuje špatným výživným stavem, překrvením vnitřních orgánů a vodnatým až zpěněným obsahem bacheru. Tyto projevy vedou často k rychlému úhynu. Při druhém procesu dochází ke ztrátě plachosti, snížení vnímavosti, slepotě a poté k rychlému uhynutí. Tyto příznaky způsobuje S-metylcysteinsulfoxid (stavební látka bílkovin), který je v průběhu trávení přeměněn na jedovatý dimetyldisulfid. Ten po vstřebání do krve způsobí rozpad červených krvinek, což má za následek nedostatečné okysličení krve. Ta následně nemůže dostatečně zásobovat kyslíkem důležité orgány a dochází k poruše mozkových center a poté ke změnám chování (VODŇANSKÝ 2008).

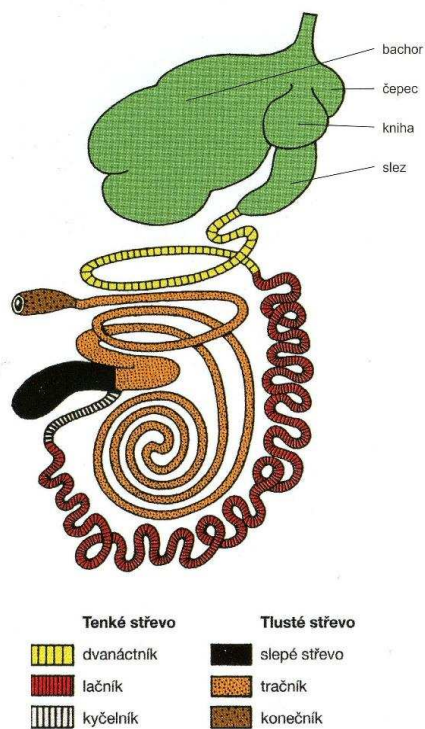
Pro přežití nepříznivých podmínek si srnčí zvěř vytvořila několik adaptací, vedoucích k tomu, že v zimním období má výrazně nižší spotřebu energie. V zimním období stačí srnčí zvěři pouze vlastní zásoby tuku a malé množství méně kvalitní potravy. Nejvýraznější adaptací je zmenšení trávicího traktu, zmenšení jeho vnitřní vstřebávací plochy, vymizení mikroorganismů, které jsou specializovány na energeticky bohaté složky potravy a zpomalení metabolismu (KAMLER 2009). V období prosinec - leden má bacher srnčí zvěře nejmenší plochu vnitřní strany svalové stěny a bacherové papily jsou redukovány. V jarním období, kdy srnčí zvěř začíná přijímat více zelené potravy, se zvětší papily a plocha bacheru se zvětší 18 až 20 krát (VACH 1993). K začátku těchto změn dochází při změně potravy a její kvality. Jadrná krmiva jsou atraktivní pro srnčí zvěř celoročně, ale přirozené jsou pouze v podzimním období, kdy si vytváří tukové zásoby. V tomto období je minimální riziko vzniku trávicích poruch. Při přijímání jadrného krmiva po přechodu do klidového stadia, nastane zvýšení intenzity metabolismu a tím spotřeby energie a hrozí vznik akutní acidózy (KAMLER 2009).

2.3 Anatomie a fyziologie trávicího traktu srnce obecného

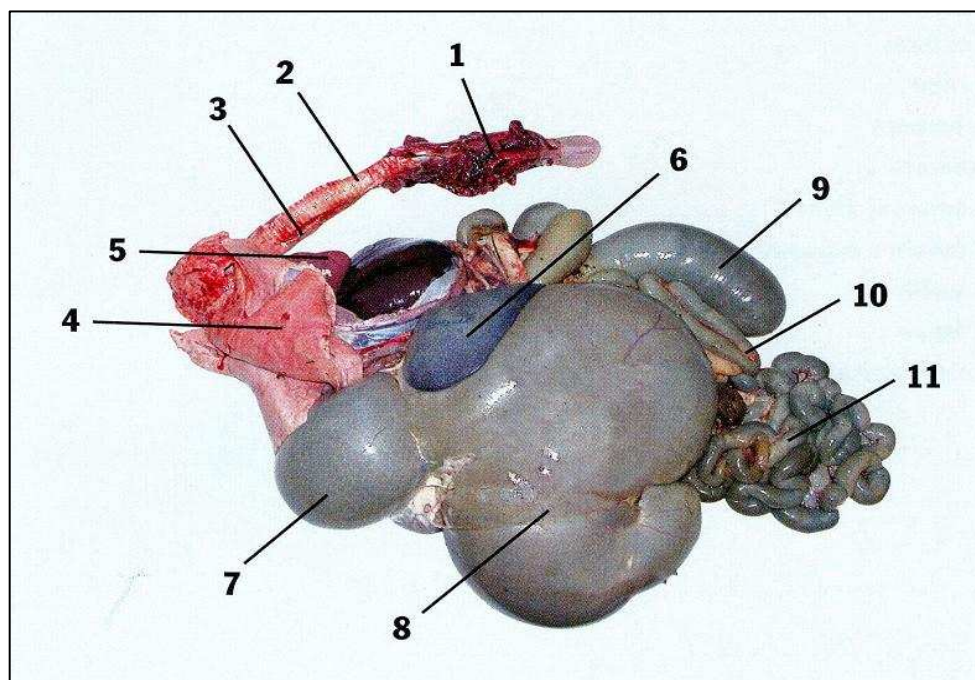
Trávicí soustava (Obr. 1,2) umožňuje příjem, dopravu a zpracování potravy, vstřebávání využitelných látek a transport nevyužitelných zbytků potravy.

Dutina ústní slouží k příjmu, rozmělnění a zvlhčení potravy. Ta následně prochází hltanem, přes jícnem do žaludku. Přežvýkavci mají vícekomorový složitý žaludek. Před vlastním žaludkem (slez) je předžaludek, který se skládá ze tří komor (bachor, čepec, kniha). Bachor a čepec tvoří společnou dutinu, potrava se zde pohybuje tam a zpět a je zde podrobena fermentačním procesům. Dobře rozmělněná potrava se posouvá do knihy, kde dochází k reabsorbci vody z tekutého chymu (FOREJTEK A KOL. 2009). Další částí trávicí soustavy je střevní kanál, což je mnohonásobně stočená trubice (WINKELMAYER A KOL. 2005). Začíná tenkým střevem, které má délku 10-15 metrů. Díky enzymům slinivky břišní a jater se zde dokončuje proces trávení živin a dochází ke vstřebávání produktů trávení. Vstřebávání bílkovin je zahájeno již ve slezu, zbytek probíhá v tenkém střevě. Zde také probíhá vstřebávání tuků. K jejich zpracování přispívá žluč, která se dostává žlučovými kanály do dvanáctníku. Nestrávený a neresorbovaný zbytek potravy se posouvá do tlustého střeva. V první části, kterou tvoří slepé střevo, se štěpí vláknina a ostatní živiny, které nebyly fermentovány v bachoru. Poté zpracovaná potrava postupuje do tlustého střeva o délce 4 až 6 metrů. Zde se nestravitelná potrava vysušuje a přeměňuje na trus. Trávicí soustava ústí v konečník, který přechází v řitní kanál zakončený řitním otvorem (VACH 1993).

Obr. 1: Stavba zažívacího traktu srnce obecného (Winkelmayer a kol., 2005)



Obr. 2: Orgány srnce obecného (Forejtek a kol., 2009).



1 - jazyk, 2 - průdušnice, 3 - jícn, 4 - plíce, 5 - srdce, 6 - slezina, 7 - čepec, 8 - bachor, 9 - slepé střevo, 10 - tlusté střevo, 11 - tenké střevo

Uspořádání a stavba předžaludku srnčí zvěře

Způsob výživy a intermediální metabolismus přežvýkavců se značně liší od ostatních býložravců. Přežvýkavci zpracovávají a tráví potravu v předžaludcích, kde aktivita mikrobiální enzymů je nejvyšší, a pak v menší míře v tlustém střevě. Mikrobiální fermentace potravy u nepřežvýkavých býložravců probíhá převážně v tlustém střevě (STEVENS; HUME 1995). Struktura trávicího traktu přežvýkavců je ukázkou dokonalého přizpůsobení na plné využití rostlinného krmiva. Ve srovnání s ostatními druhy zvířat spočívá tato adaptace hlavně ve zvláštním uspořádání žaludku (BARTOŠ 1987).

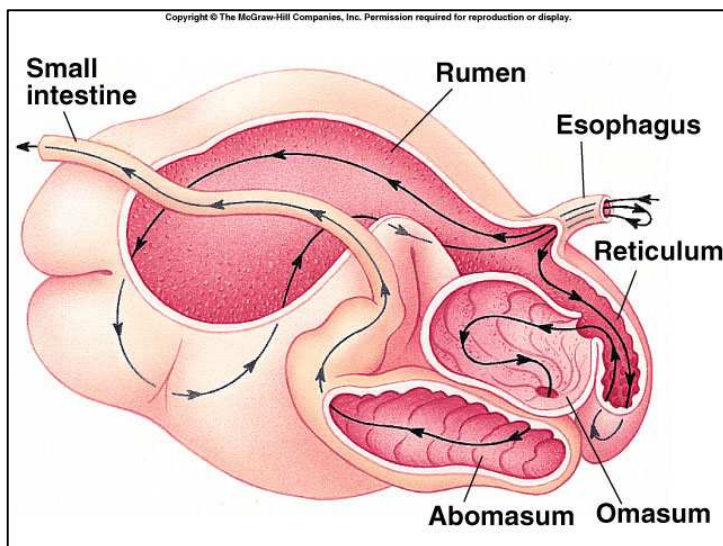
Před vlastním žaludkem (slezem, *abomasum*) má srnčí zvěř předžaludek, který má tři oddíly: bachor (*rumen*), čepec (*reticulum*), knihu (*omasum*) (Obr. 3). Podle věku srnčí zvěře a ročního období je objem předžaludků 2 až 6 litrů. Svalovina předžaludku je uspořádána do dvou vrstev hladkého svalstva (zevní podélně probíhající vrstva a vnitřní kruhově probíhající vrstva). U dospělých jedinců je největším oddílem bachor (HOLUB A KOL. 1969). Jedná se o velký svalnatý vak, uložený na levé straně břišní dutiny (FRANDSON 1974). Bachor nikdy nezůstane prázdný a také se nikdy nenaplní do plné kapacity. Po dlouhé ranní periodě bývá naplněn zhruba na 60 až 70 % (VACH 1993). Stěny bachoru jsou vystlány kutánní sliznicí (KOLEKTIV AUTORŮ 1999), což je silná vrstva zrohovatělého, mnohvrstevnatého dlaždicovitého epitelu, který vytváří papily o výšce až 1 cm. Ty zvětšují resorpční plochu bachoru.

Nejmenší z oddílů předžaludku je čepec, který má kulovitý tvar. Stěna čepece má podobnou strukturu jako stěna bachoru. Sliznice vytváří lišty vysoké zhruba 1 cm, které ohraničují čepcové sklípky. Čepec je propojen s dutinou bachorovou pomocí čepcobachorového splavu, který je široce otevřený a s knihou čepcoknihovým otvorem. Kniha je spojena s vlastním žaludkem knihoslezovým otvorem. Tento otvor je uzavíratelný dvěma poloměsíčitými chlopněmi a svalovým valem na její spodní části. Sliznice na stěně knihy vytváří vysoké řasy tzv. listy. Ty se rozlišují podle velikosti na listy I.-IV. řádu.

Z bachoru do slezu se posouvají nestrávené rostlinné bílkoviny a plnohodnotné bílkoviny obsažené v biomase mikroorganismů postupujícím z bachoru. Oba tyto druhy bílkovin se následně tráví ve slezu a ve střevě.

Vedle degradačních procesů v předžaludku dochází k důležité syntéze vitamínů. Syntetizuje se např. vitamín K, který je rozpustný v tucích. Z vitamínů rozpustných ve vodě je to např. vitamín B₁, B₂, H a B₆ (HOLUB A KOL. 1969).

Obr. 3: Uspořádání předžaludku (The McGraw-Hill Companies, Inc.)



Motorická činnost předžaludku srnčí zvěře

Bachor, čepce a kniha vykonávají rytmické pohyby, které jsou přerušovány pravidelnými dobami klidu. Po narození začínají pohyby při přechodu na voluminózní krmivo. Pohyby bachoru a čepce jsou v úzké závislosti a jsou nazývány jako tzv. čepcobachorové cykly. Délka jednoho cyklu je různě dlouhá. Průměrná doba činí 1 minutu. Čepcobachorový cyklus je tvořen dvěma kontrakcemi čepce a dvěma kontrakčními vlnami bachoru. Kontrakce čepce nastává jako první, začíná u jícnového žlabu a jako kontrakční vlna se šíří po stěně čepce. Na tuto kontrakci, kdy se čepce smrští zhruba o polovinu, navazuje druhá kontrakce, kdy se čepce smrští ještě více.

První kontrakce čepce přechází v primární kontrakci bachoru, při které dochází k jeho smrštění. Po primární kontrakci bachoru nastává sekundární kontrakce, u které dochází k dalšímu smrštění.

Při kontrakcích bachoru dochází k promíchání jeho obsahu, k vypuzení plynů a k přechodu bachorového obsahu do čepce. Při kontrakcích čepce se uskutečňuje přechod tužšího obsahu z čepce zpět do bachoru, přechod tekutějšího obsahu do slezu a knihy a dochází ke zředění obsahu bachoru.

Frekvence čepcobachorového cyklu je závislá na velikosti náplně bachoru a čepce. Menší náplň snižuje frekvenci a vyšší náplň naopak frekvenci zvyšuje.

Během druhé kontrakce čepce dochází k dilataci svěrače čepcoknihového, tím se sníží tlak v kanálu knihy a obsah se do ní přesouvá. Poté, co kontrakce čepce odezní, se smrští svěrač čepcoknihový a nastává stažení knihy.

Kontrakce knihy začínají tak, že u konce jícnového žlabu se smrští čepcoknihové ústí, následně se smrští předsíň, most a nakonec stěna knihy. Během sekundární bachorové kontrakce nastává u knihy druhé smrštění, které je menší. Kontrakce knihy trvají delší dobu než smrštění bachoru a čepce. Smršťování a zvýšený tlak uvnitř knihy napomáhají k drcení hrubých částic. Pohyby knihy a sliznicové výrůstky usnadňují posun obsahu do slezu. Obsahy knihy a slezu se posouvají do střev během period klidu (HOLUB A KOL. 1969).

2.4 Mikroflóra a mikrofauna bachoru

Prostředí bachoru představuje ideální podmínky vhodné pro život mikroorganismů. Je zde anaerobní prostředí, pH se pohybuje u zdravých jedinců podle složení krmiva zpravidla v rozmezí 6 – 7 a je zde také vysoký obsah vody. Teplota je dána teplotou hostitele, krmiva a intenzitou fermentace a pohybuje se mezi 39 - 40 °C. Bachorové mikroorganismy přispívají zásadním způsobem ke zpracování rostlinné potravy. Dochází zde ke štěpení rostlinných polysacharidů, jak strukturálních (celulóza, hemicelulóza a pektin), tak i zásobních (škrob, inulín). Počet přítomných mikroorganismů kolísá podle ročního období, nejméně jich je v období listopad - leden. Řada faktorů má vliv na poměr mezi jednotlivými druhy: složení potravy, stupeň anaerobiózy, průběh trávení, fyziologický stav zvířete a hodnota pH (HOLUB A KOL. 1969). Jednotlivé druhy mikroorganismů mají různou toleranci k měnícím se podmínkám bachorového prostředí, především složení bachorové zažitiny, ale i stupni anaerobiózy a pH. Bakterie, které štěpí nestrukturální sacharidy (škrob) požadují pH v rozmezí 5-6,6. Celulolytické bakterie, které štěpí celulózu, hemicelulózu a pektin snášejí pH od 6,2 do 6,8. Prvky nacházíme v bachoru při pH 6,2-6,6 (ANONYMOUS 2011A).

Bakterie

Mikrobiální populace je tvořena hlavně bakteriemi. Jejich počet je závislý především na složení diety, kolísá v rozmezí 10^9 - 10^{11} .ml⁻¹. Velikost bakterií je individuální, pohybuje se mezi 0,3 až 50 μm. Rovněž jejich tvar je různorodý, od tyčovitého po kulový (koky). Účastní se štěpení strukturních polysacharidů případně i zásobních polysacharidů (FLINT 1997). Existuje více než 2 000 druhů bakterií. Jestliže se koncentrace bakterií pohybuje v rozmezí nejméně 10^8 - 10^{10} .ml⁻¹, označujeme je za dominantní (v bachoru asi 20-30 druhů). V posledních letech bylo prokázáno, že v bachoru žije velký počet bakterií, které nelze kultivovat v podmínkách *in vitro*. Je možné, že těchto bakterií je dokonce většina (WILMES; BOND 2006). V literatuře je rozdělení bakterií vyskytujících se v bachoru nejednotné. Roztřídění na základě metabolického produktu či štěpeného substrátu je uvedeno v tabulce II. (KAMRA 2005)., Řada bakterií dovede využívat několik různých substrátů, a proto se jednotlivé skupiny překrývají.

Tab. II.: Rozdělení významných bachorových bakterií podle metabolizovaného substrátu

Celulolytické bakterie	Xylanolytické bakterie
<i>Fibrobacter succinogens</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Ruminococcus alsus</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>Clostridium cellobioparum</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
<i>Clostridium longisporum</i>	<i>Ruminococcus albus</i>
<i>Clostridium lochheadii</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	<i>Eubacterium ruminantium</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	
<i>Cellulomonas fimi</i>	Lipolytické bakterie
	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
Hemicelulolytické bakterie	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Treponema bryantii</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Eubacterium sp.</i>
<i>Ruminococcus sp.</i>	<i>Fusocillus sp.</i>
<i>Eubacterium xylanophilum</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
<i>Eubacterium uniformis</i>	<i>Clostridium lundense</i>
<i>Clostridium proteoclasticum</i>	
<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i>	

Amylytické bakterie	Chitinolytické bakterie
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	<i>Clostridium tertii</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	
<i>Streptococcus bovis</i>	Pektinolytické bakterie
<i>Succinimonas amylolitica</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
	<i>Prevotella ruminicola</i>
Proteolytické bakterie	<i>Lachnospira multiparus</i>
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Treponema saccharophilum</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	
<i>Clostridium bifermentans</i>	
<i>Clostridium proteoslasticum</i>	

Prvoci

Kromě bakterií mají významnou úlohu v bachoru také prvoci (10^4 - 10^6 ml⁻¹). Bylo popsáno asi 160 druhů prvoků vyskytujících se v bachoru, běžných je přibližně 40 (JOUANY 2006). Většina bachorových prvoků jsou zástupci třídy *Ciliata*. Z morfologického hlediska se prvoci dělí na dvě velké podtřídy: *Entodiniomorpha* a *Holotricha* (HUNGATE 1966; DEUTSCH A KOL. 1997). Mikrobiální biomasa je tvořena ze 40% prvoky, kteří jsou poměrně citliví k vnějším vlivům. Např. po chemickém zásahu, při dlouhotrvajícím hladovění zvíře nebo při extrémních hodnotách pH mohou i vymizet. Jejich hlavní účel v bachoru je štěpení polysacharidů, především škrobu, hemicelulózy a částečně celulózy (DEVILLARD A KOL. 2003).

Houby

Anaerobní houby jsou speciální skupinou mikroorganismů osídlující bachorové prostředí (TRINCI A KOL. 2001). Poprvé byla prokázána jejich přítomnost v bachoru přežvýkavců v 70. letech 20. století (ORPIN 1975). Do dnešní doby bylo izolováno a popsáno 21 druhů anaerobních hub, které náleží do 6 rodů: *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces* a *Anaeromyces* (THEODOROU A KOL. 1996). Oproti bakteriím nedosahují houby takové početnosti a pohybují se okolo 10^3 - 10^5 ml⁻¹. Jejich

hlavní význam v bachoru je degradace rostlinných pletiv, čímž umožní bakteriím snadný přístup do míst pro ně původně nedostupných. Jsou producenty široké řady enzymů, včetně celuláz a xy lanáz (LOWE A KOL. 1987; TEUNISSEN A KOL. 1993).

2.5 Účast hydrolytických enzymů v bachorové fermentaci

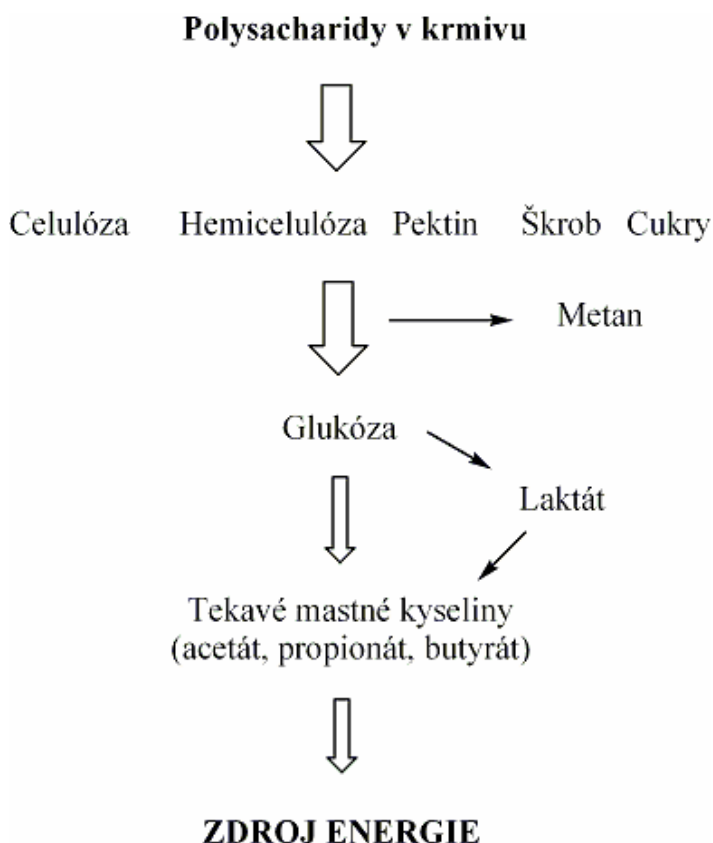
Základní složky potravy srnčí zvěře jsou sacharidy, tuky a bílkoviny. V trávicím traktu se musí tyto látky rozložit na jednodušší vstřebatelné složky, aby mohli být zvěří patřičně využity. K enzymatickému štěpení a rozkladu potravy u přežvýkavců slouží bachor. Zde přítomné mikroorganismy produkují širokou škálu enzymů potřebných pro úplné odbourání všech složek potravy. Tyto enzymy degradující především polysacharidy rostlinných pletiv není schopen organismus hostitele-přežvýkavce produkovat, proto se v průběhu fylogenetického vývoje vytvořilo toto symbiotické spojení (BAUCHOP 1977).

Podle místa účinku se dělí enzymy na intracelulární a extracelulární. Intracelulární enzymy (většina) zůstávají uvnitř buňky, kde vznikly a vykonávají zde své specifické funkce. Extracelulární enzymy jsou vylučovány vně buňky, vyskytují se v tkáňových kapalinách (např. krev, moč, trávicí šťávy), u mikroorganismů jsou vylučovány do vnějšího prostředí. Enzymy byly původně pojmenovávány náhodnými triviálními názvy, některé se dodnes používají (pepsin, trypsin). Později byla pro název zvolena koncovka –asa (česky –áza) a název je tvořen podle substrátu, který enzym katalyzuje např. amyláza, celulóza a nebo podle charakteru katalyzované reakce např. oxidáza, hydroláza. Základem klasifikace je rozdělení enzymů do šesti hlavních tříd podle typu katalyzované reakce na oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. Dále jsou enzymy tříděny do podtříd a skupin, což umožňuje vytvoření čtyřmístného číselného kódu (EC číslo). Třetí skupinu enzymů tvoří hydrolázy. Štěpí hydrolyzovatelné vazby za účasti vody, které vznikly kondenzací (např. peptidové, glykosidové, esterové). Jsou početnou skupinou enzymů, vesměs povahy jednoduchých bílkovin, plní řadu biochemicky nezastupitelných funkcí v organismu např. při trávení, při srážení krve pomocí thrombinu (VODRÁŽKA 1996).

Polysacharidy jsou v bachoru využívány přítomnými mikroorganismy až na volné mastné kyseliny, které představují primární zdroj energie pro hostitele (Obr. 4). 30-50% celulóзовého materiálu je v bachoru štěpeno mikrobiální populací, 60% škrobu je degradováno v závislosti na množství potravy a na rychlosti posunu potravy bachorem.

Většina cukrů je v bacheru zcela degradována. Těkavé mastné kyseliny jsou absorbovány do krevního řečiště a transportovány do tělních tkání, kde jsou využity jako zdroj energie pro zachování, růst, reprodukci a pro tvorbu mléka (BARTOŠ 1987).

Obr. 4: Využití strukturních polysacharidů z potravy



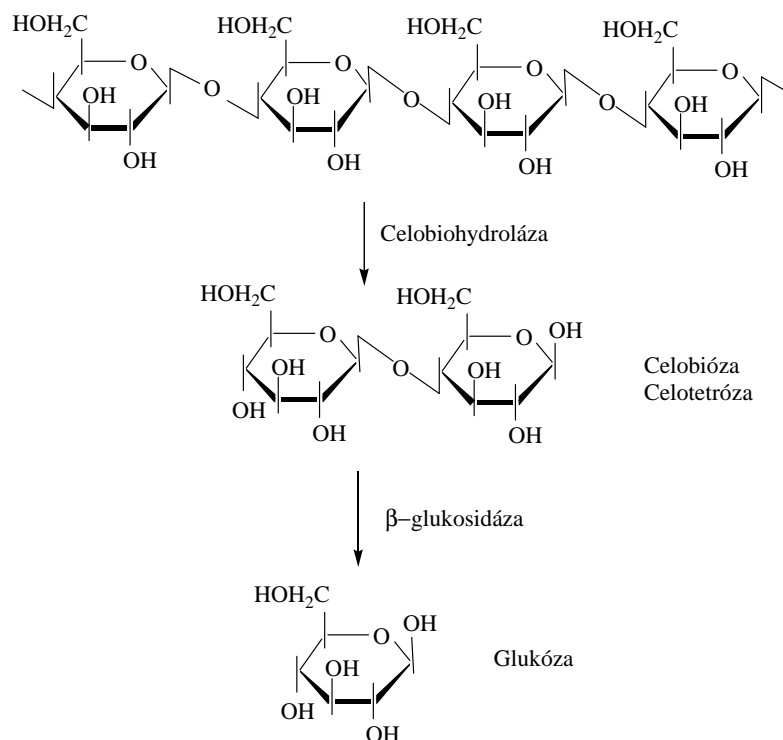
2.5.1 Celulolytické enzymy

Celulóza je nejvíce zastoupeným polysacharidem v přírodě. Je složena z glukózových jednotek spojených β -1,4 glukosidickou vazbou. Štěpení celulózy na jednoduché cukry (disacharid celobiózu a monomer glukózu) vyžaduje přinejmenším dva typy hydrolytických enzymů: endoglukanázy a exoglukanázy (především celobiohydrolázu), které uvolňují celobiosylové jednotky z neredukujících konců celulózoového řetězce (Obr. 5). Mezi enzymy nezbytné pro hydrolyzu přírodní celulózy řadíme endoglukanázu, celobiohydrolázu a β -glukosidázu.

Již v 60. letech minulého století byly z bacheru izolovány a popsány tři rody celulolytických bakterií: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* a

Ruminococcus albus (HUNGATE 1966). Celulolytická aktivita byla popsána také u anaerobních hub *Neocalimastix frontalis*, *Orpinomyces joyonii* a *Caecomyces communis* (TEUNISSEN A KOL. 1993; HODROVÁ A KOL. 1998) a u prvoků (COLEMAN 1971).

Obr. 5: Štěpení celulózy



Endoglukanáza (EC 3.2.1.4)

Systematický název: 4- β-D- glucan 4-glucanohydrolase

Alternativní názvy: Celulóza, Karboxymetyl celulóza, endo-1,4-β-glukanáza

Endoglukanáza štěpí 1,4-β-D-glykosidické vazby celulózy. Zajišťuje štěpení rostlinných vláken na menší celky, které obsahují D-glukózu. Přítomnost endoglukanázy byla popsána u bacherových bakterií *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogens* (RUSELL; WILSON 1996).

Celobiohydroláza (EC 3.2.1.91)

Systematický název: 4- β -D-glucan cellobiohydrolase

Alternativní názvy: Exoglukanáza

Enzym hydrolyzuje 1,4- β -D-glykosidické vazby, z neredukujícího konce polysacharidového řetězce odštěpuje disacharid celobiózu (KOPEČNÝ; HODROVÁ 1997). Produkce celobiohydrolázy byla popsána u bacherových bakterií *Ruminococcus flavefaciens*, *Cellulosilyticum ruminicola* (CAI S. A KOL. 2010), a také u anaerobních hub *Neocalimastix patriciarum* (DENMAN 1992).

β -glukosidáza (EC 3.2.1.21)

Systematický název: β -D-glucoside glucohydrolase

Alternativní názvy: celobiáza

β -glukosidáza je glukosidázový enzym, štěpící β -1-4 vazby. Je specifický pro různé β -D-glykosidové substráty (např. disacharid celobiózu), z nichž se při hydrolýze uvolňuje glukóza (ANONYMOUS 2011b). V bacheru produkce: anaerobní houby *Orpinomyces*, *Neocalimstix frontalis* (LI X. 1991), bakterie *Bacteroides ruminicola*.

2.5.2 Chitinolytické enzymy

Po celulóze je druhým nejvíce zastoupeným polysacharidem v přírodě chitin. Nachází se v buněčných stěnách vyšších hub a ve skořápkách korýšů. Je nerozpustný ve vodě i v mnohých organických rozpouštědlech. Částečnou N-deacetylací chitinu vzniká chitosan, lineární polysacharid tvořený jednotkami glukosaminu a N-acetylglukosaminu spojenými 1,4- β -glykosidickou vazbou. Produkce chitinolytických enzymů byla popsána u řady mikroorganismů, především hub a bakterií. Extracelulární komplex chitinolytických enzymů byl popsán u bakterií izolovaných z trávicího traktu přežvýkavců (ŠIMŮNEK A KOL. 2001, 2004). Mikrobiální degradace chitinu zahrnuje několik kroků (Obr. 6). Chitinázy hydrolyzují chitin na oligosacharidy. Ty jsou následně působením tří enzymů (β -N-acetylglukosaminidáza, glukosaminidáza a chitobiosidáza) degradovány na monomer N-acetylglukosamin a v menší míře na chitobiosid (GOODAY 1990).

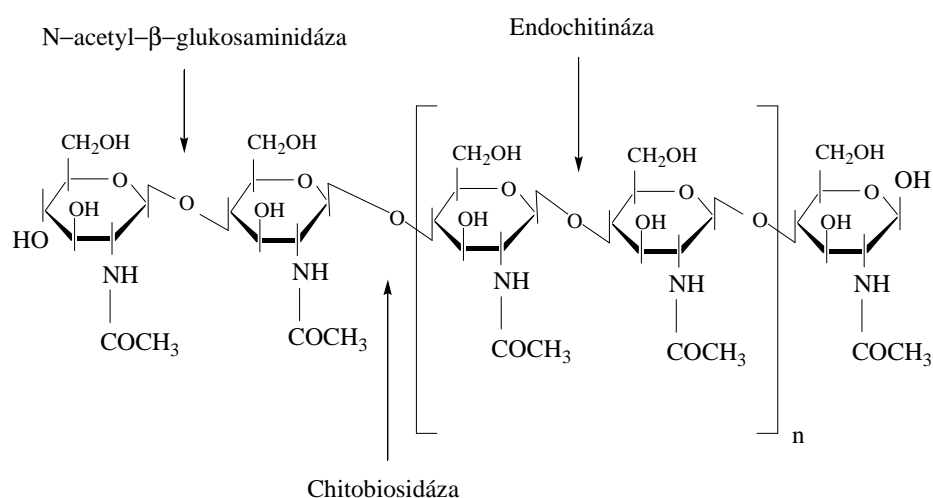
Chitináza (EC 3.2.1.14)

Systematický název: (1→4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucan glycanohydrolase

Alternativní název: Endochitináza

Produkce byla popsána u bachorové houby *Anaeromyces*, *Orpinomyces* (NOVOTNÁ A KOL. 2008)

Obr. 6: Štěpení chitinu



N-acetylglucosaminidáza (EC 3.2.1.50)

Systematický název: α-N-acetyl-D-glucosaminide N-acetylglucosaminohydrolase

Alternativní název: glykosidáza, NAGáza

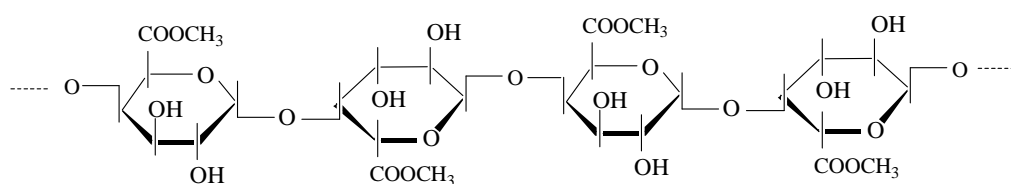
Produkce byla popsána u bachorové bakterie *Clostridium aminovalericum* (ŠIMŮNEK A KOL. 2004)

2.5.3 Pektinolytické enzymy

Hodnotnou složku rostlinné potravy představují pektiny. Jsou to strukturní polysacharidy, nacházející se hlavně ve střední lamelle a primární buněčné stěně vyšších rostlin. Trávy obsahují v sušině 3–4 % pektinu (WAITE; GORROD 1959), luštěniny 5-10% (VAN SOEST 1983) a obsah pektinu v řepných řízcích dosahuje až 25% (ASPINALL 1970). Základní struktura molekula tohoto polysacharidu je tvořena lineárním řetězcem jednotek

D-galakturonové kyseliny (25-100) spojených α -1,4 vazbou. Tento řetězec se nazývá polygalakturonová kyselina (Obr. 7). Do různého stupně jsou jednotky galakturonové kyselina esterifikovány methanolem. Degradace pektinu se v bachoru účastní řada bakterií - *Prevotella ruminicola*, *Lachnospira multiparus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* (BRYANT; SMALL 1956; MAROUNEK; DUŠKOVÁ 1999) a některé druhy prvoků – *Diploplastron*, *Entodinium*, *Isotricha* (COLEMAN A KOL. 1971). Fermentace pektinu je doprovázena tvorbou vysokého množství plynu, což přispívá k nadýmání (VAN SOEST 1983) a často může být příčinou vážných onemocnění. Na štěpení pektinu se podílejí enzymy: pektinmetyleráza (štěpí pektin na kyselinu polygalakturonovou a methanol), pektinázu a pektátlyázu (odštěpuje digalakturonát nehydrolytickým mechanismem) (WOJCIECHOWICZ 1971).

Obr. 7: Základní struktura pektinu



Pektináza (EC 3.2.1.15)

Systematický název: (1→4)- α -D-galacturonan glycanohydrolase

Alternativní název: Polygalakturonidáza, pektin hydroláza, pektin depolymeráza

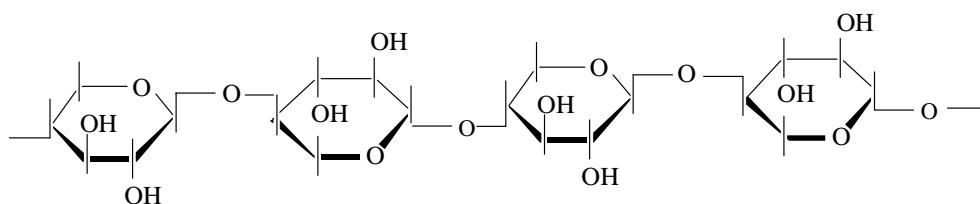
Pektináza katalyzuje hydrolýzu α -1,4-glykosidové vazby kyseliny polygalakturonové, za tvorby kyseliny galakturonové. Aktivita pektinázy byla popsána u řady bachorových bakterií např. *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (KOPEČNÝ; HODROVÁ 1995), *Lachnospira multiparus* (DUŠKOVÁ; MAROUNEK 2001) a bachorových hub, např. *Neocallimastix* a *Orpinomyces* (KOPEČNÝ; HODROVÁ 1995).

2.5.4 Xylanolytické enzymy

Xylan je polysacharid složený převážně z jednotek xylózy spojených β -1,4 vazbou (Obr. 8). V postranních řetězcích obsahuje xylan řadu neutrálních cukrů (arabinóza,

glukóza, galaktóza, kyselina uronová) v závislosti na rostlinném zdroji. Je hlavním polysacharidem buněčných stěn rostlin. V bacheru je degradován pouze v malém měřítku. Z bacheru bylo izolováno řada xylanolytických druhů bakterií, prvoků a hub. Mezi hlavní zástupce patří bakterie *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogens*, *Ruminicoccus albus* (DEHORITY 1965, 1966), *Eubacterium ruminantium* (HESPELL; WHITEHEAD 1990) a *Prevotella ruminicola* (BRYANT; SMALL 1958).

Obr. 8: Základní struktura xylanu



Xylanáza (EC 3.2.1.8)

Systematický název: 4- β -D-xylan xylanohydrolase

Skupina enzymů, degradujících lineární polysacharid, štěpí β -1,4-vazbu s produkcí monosacharidové jednotky xylózy. Xylanázová aktivita byla popsána u bacherových hub např. *Neocallimastix frontalis*, *Anaeromyces mucronatus* (LOWE A KOL. 1987; NOVOTNÁ A KOL. 2010) a bacherových bakterií např. *Anaeromyces ruminicola* (AN A KOL. 2006).

2.5.5 Enzymy štěpící zásobní polysacharidy

Hlavní zásobní polysacharid rostlin je škrob. Je tvořen z lineárního polysacharidu amylozy a větveného polysacharidu amylopektinu. Amylóza i amylopektin jsou tvořeny jednotkami α -D-glukózy. Přírodní škrob obsahuje 10-20% amylozy a 80-90% amylopektinu. Jeho hydrolýzou jsou dlouhé polysacharidové řetězce štěpeny na kratší, případně se uvolňuje maltóza či glukóza.

Inulin (Obr. 9) je složen z jednotek fruktózy spojených β -1,2 vazbou. Koncovou jednotkou bývá glukóza. U některých rostlin nahrazuje zásobní polysacharid škrob. Bakteriální mikroflórou je inulin plně degradován (CHESSON; FORSBERG 1997).

A-amyláza (EC 3.2.1.1)

Systematický název: 1.4- α -D-glukan glucanhydroláze

Tento enzym katalyzuje hydrolýzu 1.4- α -D-gluosidických vazeb. Produkce byla popsána u anaerobních hub *Neocalimastix frontalis* (MOUNTFORD; ASHER 1988) a bachorových bakterií *Clostridium butyricum* (HOBSON; MCPHERSON 1952).

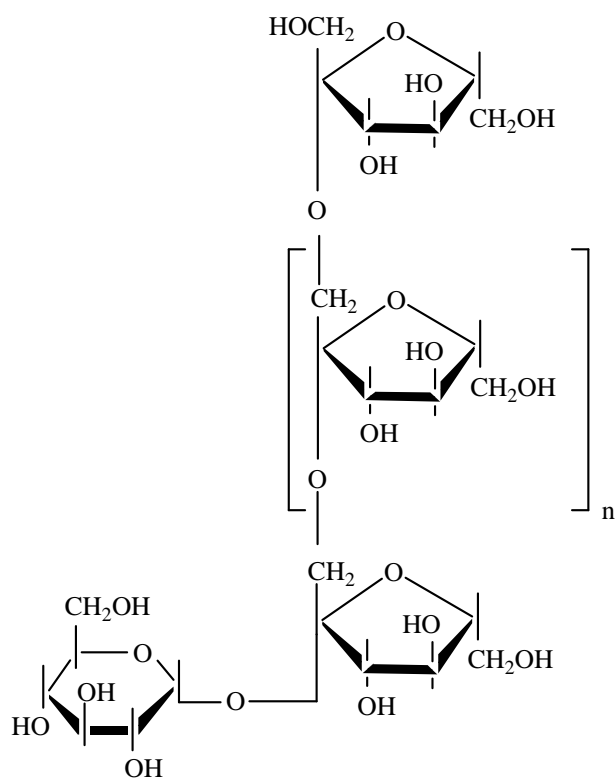
Inulináza (EC 3.2.1.7)

Systematický název: 1-beta-D-fructan fructanohydrolase

Alternativní název: endoinulináza

Mikrobiální inulináza odštěpuje koncové jednotky D-fruktózy. Produkce inulinázy byla popsána u bakterií, kvasinek a hub. Nicméně za hlavní producenty se považují vyšší houby *Aspergillus* sp. (PANDEY A KOL. 1999). Degradace inulinu v bachoru byla popsána u bakterie *Treponema sacharophilum* (KASPEROWICZ; MICHALOWSKI 2002)

Obr. 9: Základní struktura inulinu



2.5.6 Lipolytické enzymy

Rostlinná potrava přežvýkavců obsahuje z převážné části 5 - 10 % lipidů z celkové sušiny (SHORTLAND 1963). Lipidy v potravě přežvýkavců pocházejí především z píce a obilí. Prvním krokem odbourávání lipidů z potravy je jejich hydrolytické štěpení, kdy dochází k uvolnění esterových vazeb a vzniku volného glycerolu a mastných kyselin (VODRÁŽKA 1996). Díky činnosti bachorových bakterií dochází k hydrolýze lipidů, málo informací je známo o podílu bachorových hub na tomto procesu (HARFOOT; HAZLEWOOD 1988). Existuje jen velmi malé množství informací o roli prvoků při degradaci lipidů.

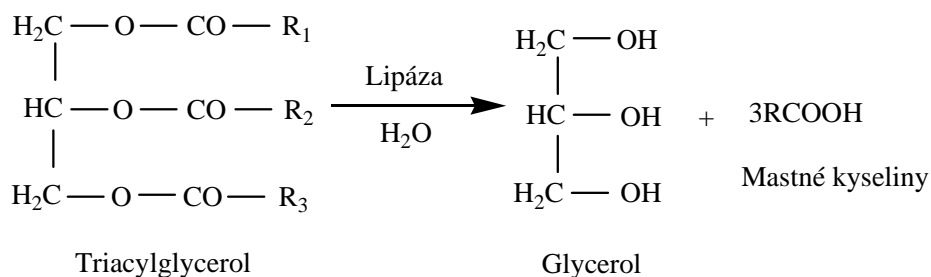
Lipáza (EC 3.1.1.3)

Systematický název: Triacylglycerol acylhydrolase

Tento enzym štěpí lipidy na glycerol a volné mastné kyseliny (Obr. 10). Je rozpustný ve vodě. Lipáza určuje množství syntetizovaného tuku, zajišťuje redukci tukové zásoby a ve vyšším množství napomáhá při jeho spalování.

V současné době je popsána řada lipolytických bachorových bakterií – např. *Anaerobrio lipolytica*, *Butyrivibrio hungatei*, *Pseudobutyrvibrio* sp., *Clostridium proteoclasticum*, *Bacillus* sp. (HOBSON; MANN 1961; CIRNE A KOL. 2006; NAWANI; KAU 2000).

Obr. 10: Štěpení lipidů



3.5.7 Proteolytické enzymy

Většina informací týkajících se proteolytické aktivity v bacheru je známa díky experimentům se směsnými kulturami mikroorganismů. Až 75% celkové bacherové proteolytické aktivity je vázána na částičky potravy, proteolytické enzymy jsou vesměs vázané na buňku a aktivita v bacherové tekutině je nízká (BLACKBURN; HOBSON 1960).

Směsné kultury bakterií a prvoků vykazují silnou proteolytickou aktivitu. Na základě experimentů bylo prokázáno, že hlavní roli při degradaci proteinů hrají bakterie. Prvoci a houby mají na odbourávání proteinů pouze minoritní podíl (BROCK A KOL. 1982).

Proteáza (EC 3.4.21.64)

Souhrnný název pro skupinu enzymů hydrolyzujících peptidové vazby aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Jejich přítomnost byla popsána ve všech organismech, jsou zapojeny do velkého množství fyziologických reakcí. V bacheru byla popsána proteolytická aktivita např. u zástupců bakteriálních rodů *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Butyrivibrio*, *Streptococcus* a *Clostridium* (CHEN; RUSSELL 1989). Přestože hlavní úlohu při proteolýze hrají bakterie, byla proteolytická aktivita popsána také u prvoků (*Diplodinium pentacanthum*, *Entodinium simplex*) (COLEMAN 1983; FORSBERG A KOL. 1984) a hub (*Neocallimastix frontalis*, *Piromyces* sp.) (WALLACE; JOBLIN 1985; ASAO A KOL. 1993)

3. Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie:

Běžné chemikálie byly získány od firem Lachema a.s. Neratovice, P-LAB s.r.o. Praha a Sigma Aldrich s.r.o. Od firmy Difco byl zakoupen agar, hydrazid 4-hydroxybenzoové kyseliny od firmy Acros Organics, akrylamid od firmy Amresco.

Mikrokrytalická celulóza byla dodána z Pliva-Lachema a.s. Brno, xylóza a sodná sůl karboxymethylcelulózy od firmy Fluka-Labicom s.r.o.

Standard molekulových hmotností pro elektroforézu byl zakoupen u firmy BioRad (USA) a Fluka (Německo).

3.2 Laboratorní přístroje:

spektrometr:	Thermo spectronic Biomate 5 (Thermo Spectronic, ChromSpec, UK) Sunrise Tecan (Schoeller)
vodní lázeň:	Julabo TW 12 (Německo)
odstředivka:	MLW K 23D Janetzki (Německo) MLW K 24D Janetzki (Německo) Hawk 15/05, MSE (UK)
analytické váhy:	L420 D Sartorius laboratory
mikropipety:	Nichipet EX Nichiryō (Japonsko) Transferpette (Japonsko)
špičky:	Neptune
termostat:	TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, CZ) Vortex Zx ³ VELP (Scintifica, Itálie) Vaříč Eta 2109 000 (CZ)
	Zdroj na ELFO PowerPac 1000 (BioRad, USA)
	Fotodokumentační systém GelDoc TM XR ⁺ (Biorad)
	Softwar Image Lab verze 2.0 (Biorad)
	Ultrazvukový desintegrátor
	pH metr 3310 Jenway (Velká Británie)

Autokláv PS 20A (Chirana Praha, CZ)

Termostat TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, CZ)

Mrazicí box VT327 (Vestfrost, Německo)

GraphPad instat ver 3.0 (GraphPad software, USA)

3.3 Charakteristika lokalit, odběr a zpracování vzorků

Od začátku druhé poloviny 20. století byla krajina vlivem zemědělské činnosti, kdy prioritou byly vyšší výnosy zemědělských plodin, značně přeměňována a přestala nabízet dostatek krytu a potravy pro zvěř jako v minulosti. V některých oblastech byly změny v krajině výrazné a v jiných nedosahovaly takové razance.

Pro svou práci jsem si vybral tři lokality na okrese Mladá Boleslav, která se polní strukturou, dostupností potravy a charakteristikou území od sebe liší. Hranice mezi lokalitami je tvořena řekou Jizerou a rychlostní komunikací R10 (Obr. 11).

Území Mladoboleslavska je na rozhraní mírně teplé oblasti s mírně suchým a mírně vlhkým podnebím. Srážky jsou zde rovnoměrné po celý rok s maximem v letním období. Lokality se nacházejí v nadmořské výšce 200 až 350 m n. m., průměrné roční teploty jsou zde 8,0 – 8,5 °C s průměrnými ročními srážkami 500 až 600 mm. Rozloha polí zde značně převládá nad rozlohou lesů (MORÁVKOVÁ 2001).

Obr.11: Mapa Mladoboleslavska s vyznačenými lokalitami (A-Pravý břeh, B-Levý břeh, C-Bradlec) (www.seznam.cz/mapy)



3.3.1 Lokalita A

Tato rovinatá lokalita se nachází na pravém břehu řeky Jizery (Obr. 11). Na této straně řeky Jizery jsou matečnou horninou vápnité pískovce, které pokrývá převážně půdní typ hnědozem. Většinu této oblasti tvoří rozsáhlé lány polních monokultur. Mezi nejčastější plodiny patří řepka olejka, pšenice, ječmen a řepa cukrovka. Lesy jsou omezeny jen na stráně údolí a louky se nacházejí pouze v nivě řeky Jizery (MORÁVKOVÁ 2001). Z důvodu výrazného omezení chovu skotu, se zde už téměř nepěstují pícniny a ani neudržují (s výjimkou luk u řeky Jizery) trvalé travní plochy, které by zvýšily úživnost a potravní nabídku. V této části okresu se nenachází v polích žádné vodoteče, protože voda není zachycována přírodními překážky.

Vzorky jsem získal ze čtyř honiteb, které zaujímají celkem rozlohu 4 505 ha, z čehož orná půda tvoří 3 763 ha, les 677 ha, vodní plochy 9 ha a ostatní plochy 56 ha (Graf. 1). Srnčí zvěř se zde vyskytuje dle jarních kmenových stavů ve vysoké početnosti viz Tab. III. V posledním desetiletí zde ulovila dvě myslivecká sdružení (MS) čtyři srnce, jejichž trofeje dosahovaly význačných bodových hodnot v tabulce IV. MS Suchá-Rokytovec pravidelně přidává do krmiva minerálními doplňky a dosahuje nejsilnějších trofejí.

Tab. III: Početnost, plán lovu, lov a úhyn srnčí zvěře k 31.3. 2010 v lokalitě A

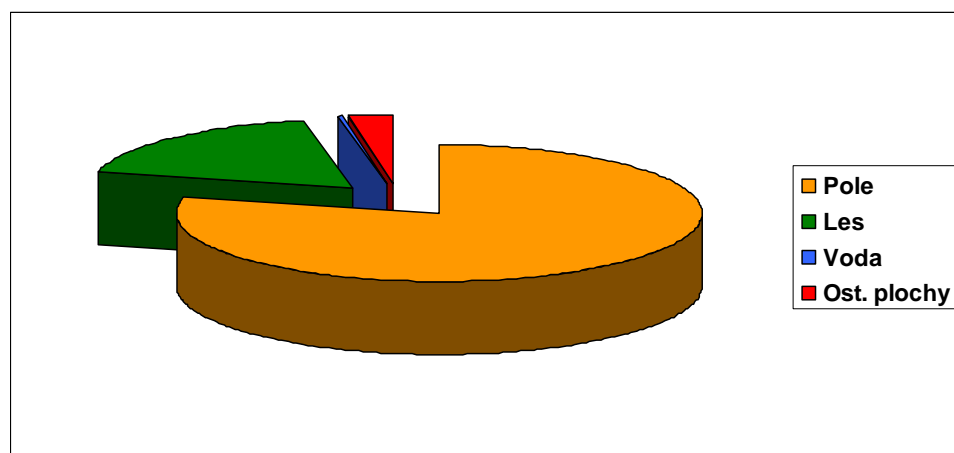
Honitba	JKS* (♂-♀-♂♀)	Plán lovu (♂-♀-♂♀)	Lov (♂-♀-♂♀)	Úhyn (♂-♀-♂♀)
MS Stařechov Jizerní Vtelno-Hrušov	40 (14-14-12)	14 (6-6-2)	5 (3-1-1)	9 (2-5-2)
MS Jezírek Bezno	81 (31-30-20)	38 (14-14-10)	22 (10-8-4)	27 (4-7-16)
MS Suchá-Rokytovec	111 (41-43-27)	66 (21-22-23)	29 (10-10-9)	19 (6-8-5)
Honitba Hájek	38 (15-12-11)	19 (7-8-4)	11 (4-3-4)	8 (2-4-2)

* jarní kmenový stav

Tab. IV: Význačné trofeje ulovené v lokalitě A v období 2005- 2010

Honitba	Datum ulovení	Body CIC
MS Stařechov Jizerní Vtelno-Hrušov	26.9.2006	110
MS Suchá-Rokytovec	29.5.2006	118,82
MS Suchá-Rokytovec	29.6.2008	115,46
MS Suchá-Rokytovec	14.9.2009	112,45

Graf.1: Zastoupení jednotlivých ploch lokality A



3.3.2 Lokalita B

Na levém břehu řeky Jizery se rozkládá druhá lokalita (Obr. 11), která je charakteristická svojí členitostí. Nenajdeme zde skoro žádné velké lány, ale menší políčka, která jsou často rozdělena větrolamy, remízky a také ve velké míře vodotečemi, které tvoří mozaiku mezi poli a zvěři zajišťují dostatek vody po celý rok. Matečnou horninou jsou zde slíny a kvadrátové pískovce, na kterých se nachází půdní typy černozem, hnědozem, oglejené půdy tzv. „černavy“ a podzol, na který jsou vázány lesy (MORÁVKOVÁ 2001). V některých částech je patrný průmyslový vliv, mezi výrobními halami a sklady nebo v jejich blízkosti se nachází neobdělávaná půda, která zvěři zvyšuje potravní nabídku a poskytuje krytové podmínky. Oproti lokalitě číslo 1. se zde nachází daleko více trvale travních ploch a v okolí kopce Chlum se můžeme setkat s několika neoplocenými sady a bývalými pastvinami, které postupně zarůstají keři a pionýrskými dřevinami.

Velikost všech šesti honiteb, z kterých byly získány vzorky je celkem 5 825 ha, orná půda zaujímá plochu o velikosti 4 603 ha, les 1 052 ha, vodní plochy 12 ha a ostatní plochy 164 ha (Graf. 2). Dvě myslivecká sdružení obhospodařují dvě honitby, jelikož původní byly rozděleny rychlostní komunikací R10. Dle porovnání jarních kmenových stavů a rozlohy je početnost srovnatelná s první lokalitou. V uplynulých deseti letech zde bylo uloveno 5 význačných trofejí viz. Tab. VI, převážně v oblastech, kde jsou podávány minerální doplňky.

Tab. V: Početnost, plán lovu, lov a úhyn srnčí zvěře k 31.3. 2010 v lokalitě A

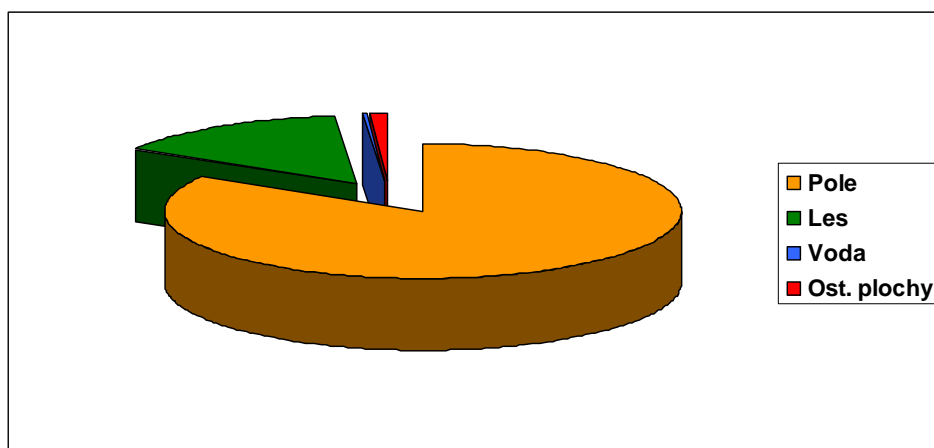
Honitba	JKS* (♂-♀-♂♀)	plán lovu (♂-♀-♂♀)	lov (♂-♀-♂♀)	úhyn (♂-♀-♂♀)
MS Chlum- Týnec	130 (53-44-33)	107 (46-37-24)	109 (39-34-36)	27 (10-12-5)
MS Bor- Sukorady	76 (28-31-17)	51 (15-18-18)	51 (15-18-18)	8 (2-3-3)
MS Rozsévačka Bezděčín	30 (14-10-6)	30 (14-9-6)	25 (11-8-6)	8 (3-1-4)
	20 (8-8-4)	14 (7-5-2)	2 (2-0-0)	11 (4-5-2)
MS Brodce nad Jizerou	43 (14-13-14)	26 (9-10-7)	12 (6-3-3)	11 (2-6-3)
	53 (19-19-15)	24 (9-8-7)	17 (7-5-5)	7 (1-4-2)

* jarní kmenový stav

Tab. VI: Význačné trofeje ulovené v lokalitě B v období 2005- 2010

Honitba	Datum ulovení	Body CIC
MS Chlum- Týnec	23.7.2008	112,48
MS Chlum- Týnec	26.9.2007	99,88
MS Bor- Sukorady	12.8.2007	102,75
MS Bor- Sukorady	2.8.2004	109,85
MS Brodce nad Jizerou	8.8.2006	119,42

Graf.2.: Zastoupení jednotlivých ploch lokality B



3.3.3 Lokalita C

Třetí oblast se nachází mezi řekou Jizerou a rychlostní komunikací R10 v blízkosti města Mladá Boleslav (Obr. 11), které ji významně ovlivňuje. Lokalita je charakteristická svou krajinou různorodostí. Na jižní části území se rozkládá národní přírodní park (NPP Radouč), kde jsou rozšířené xerothermní traviny (MORÁVKOVÁ 2001), na které navazují jen z části oplocené zahrádkářské kolonie. Ve střední části lokality se vyskytují menší lesní celky, které navazují na řeku Jizeru, rozsáhlá motokrosová dráha, která již neslouží svému účelu a území, která jsou určena k výstavbě a dočasně ponechána ladem. Pole s ojedinělými remízky se vyskytují hlavně v severní části a částečně v příměstské oblasti města Mladá Boleslav. Další důležitou charakteristikou je izolovanost území, kde na jižní straně tvoří hranici město, na západě až severozápadě řeka Jizera a na východě až severovýchodě rychlostní komunikace R10. Srnčí zvěř je zde značně izolovaná a má jen omezené možnosti migrace.

Tuto lokalita o velikosti 691 ha, která je tvořena 491 ha polní půdy, 188 ha lesní půdy a 12 ha vodními plochami (Graf. 3), obhospodařuje pouze jedno myslivecké sdružení (MS Bradlec). Dle jarního kmenového stavu se zde vyskytuje zhruba 50 kusů srnčí zvěře viz Tab. VII. Za posledních deset let zde byly uloveny 2 význačné trofeje viz. Tab. VIII. Kvalita trofejové srnčí zvěře je zde z důvodu dobré dostupnosti pestré přirozené potravy velmi vysoká.

Tab. VII: Početnost, plán lovu, lov a úhyn srnčí zvěře k 31.3. 2010 v lokalitě C

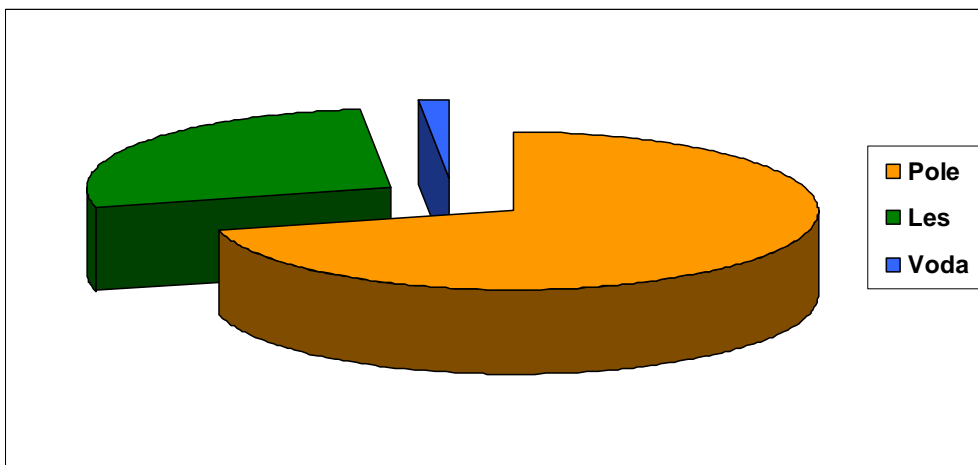
Honitba	JKS* (♂-♀-♂♀)	Plán lovu (♂-♀-♂♀)	Lov (♂-♀-♂♀)	Úhyn (♂-♀-♂♀)
MS Bradlec	51 (18-17-16)	18 (8-6-4)	15 (7-5-3)	5 (1-3-1)

* jarní kmenový stav

Tab. VIII: Význačné trofeje ulovené v lokalitě C v období 2005- 2010

Honitba	Datum ulovení	Body CIC
MS Bradlec	7.8.2008	112,92
MS Bradlec	23.9.2006	130,35

Graf. 3: Zastoupení jednotlivých ploch v lokalitě C



3.3.4 Odběr vzorků:

Vzorky bachorového obsahu srnčí zvěře byly odebrány ve třech uvedených lokalitách Mladoboleslavska. Zvěř byla ulovena v ranních nebo večerních hodinách. Jednalo se o zdravou zvěř s výjimkou jednoho kusu, který jevil příznaky otravy (pravděpodobně po požití dvounulové řepky olejky), tento vzorek nebyl do souboru zkoumaných vzorků zařazen. Od každého jedince byl odebrán obsah bachoru do připravených uzavíratelných sterilních zkumavek. Ty byly v termoboxu s vychlazenými vložkami transportovány a co nejdříve (zpravidla do 1 hodiny) uloženy do mraznice o teplotě -30°C . Seznam vzorků je uveden v tabulkách (IX, X, XI). Z lokality A na pravém břehu Jizery bylo odebráno 20 vzorků, z lokality B na levém břehu bylo získáno 24 vzorků, z lokality C Bradlec bylo z důvodu nižšího lovu získáno 8 vzorků.

Z důvodu kapacity měřících přístrojů a finanční nákladnosti jednotlivých měření bylo použito ke zpracování 33 vzorků, které jsou v tabulkách označeny zeleně.

Tab. IX: Vzoroky odebrané z lokality na pravém břehu Jizery (A)
(označení, lokalita, datum, pohlaví, váha)

Pravý břeh Jizery				
označení	lokalita	datum odběru	pohlaví	váha
1	Rokytovec	20.12.	srnče	9kg
3	Rokytovec	31.12.	srna	13kg
4	Rokytovec	14.10.	srna	13kg
5	Rokytovec	1.12.	srna	11kg
6	Rokytovec	5.12.	srna	12kg
7	Rokytovec	6.12.	srnče	7kg
9	Bezno	13.11.	srna	12kg
65	Bezno	12.12.	srna	16kg
10	Jizerní Vtelno	31.12.	srnče	12kg
11	Jizerní Vtelno	20.9.	srna	14kg
12	Jizerní Vtelno	25.9.	srna	15kg
13	Jizerní Vtelno	6.9.	srna	12kg
14	Jizerní Vtelno	28.9.	srna	14kg
15	Jizerní Vtelno	3.12.	srnče	13kg
16	Jizerní Vtelno	25.9.	srna	15kg
17	Jizerní Vtelno	31.11.	srna	12kg
63	Hájek	26.12.	srna	úhyn
64	Hájek	8.1.	srnče	10kg
18	Hájek	6.10.	srna	14kg
19	Hájek	8.10.	srna	12kg

Tab. X: Vzorky odebrané z lokality na levém břehu Jizery (B)

(označení, lokalita, datum, pohlaví, váha)

Levý břeh Jizery				
označení	lokalita	datum odběru	pohlaví	váha
21	Brodce	6.11.	srna	13kg
23	Brodce	23.10.	srna	12kg
24	Brodce	23.10.	srnče	10kg
25	Brodce	23.10.	srnče	7kg
26	Brodce	28.12.	srna	11kg
27	Brodce	28.12.	srna	13kg
30	Brodce	12.11.	srnče	9kg
31	Brodce	12.11.	srna	12kg
28	Týnec	3.11.	srnče	8kg
36	Týnec	3.11.	srnče	9kg
32	Týnec	23.12.	srna	15kg
33	Týnec	1.12.	srnče	8kg
34	Sukorady	28.12.	srna	14kg
35	Sukorady	28.12.	srnče	9kg
37	Sukorady	27.12.	srna	14kg
38	Sukorady	12.12.	srnče	8kg
39	Sukorady	3.11.	srna	13kg
40	Sukorady	5.12.	srnče	10kg
41	Sukorady	3.11.	srna	13kg
22	Sukorady	30.11.	srnče	10kg
61	Sukorady	14.12.	srna	11kg
42	Bezděčín	10.12.	srnče	9kg
29	Bezděčín	10.12.	srna	13kg

Tab. XI: Vzorky odebrané z lokality Bradlec (C)

(označení, lokalita, datum, pohlaví, váha)

Bradlec				
označení	lokalita	datum odběru	pohlaví	váha
51	Bradlec	20.12.	srnče	10kg
52	Bradlec	27.12.	srna	13kg
53	Bradlec	30.12.	srna	13kg
54	Bradlec	13.12.	srna	12kg
55	Bradlec	7.12.	srnče	9kg
56	Bradlec	3.11.	srna	7kg
57	Bradlec	6.12.	srnče	9kg
58	Bradlec	12.10.	srnče	10kg

3.3.5 Zpracování vzorků

Z každého vzorku bylo naváženo 6 g obsahu bacheru do nové sterilní zkumavky. Bylo přidáno 6 ml fosfátového pufru (pH 6). Pro homogenizaci byly vzorky intenzivně třepány 30 min ($1\ 100\ \text{min}^{-1}$). Zbytky organické hmoty byly odstraněny odstředěním při $4\ 000\ \text{ot.min}^{-1}$ po dobu 15 minut. Enzymový extrakt byl zamražen při -60°C pro následnou analýzu. V enzymovém extraktu byly stanoveny aktivity sledovaných enzymů a koncentrace proteinů.

3.4 Použité roztoky:

Fosfátový pufr 100mM (pH 6): $15,6\ \text{g.l}^{-1}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Roztok Bradford (200 ml): 100 mg Coomasie Brilliant Blue G-250, rozpuštěno v 50 ml etanolu, bylo přidáno 100 ml 85 % H_3PO_4

25% kyselina trichloroctová 25 + 75 vody

0,5 N NaOH: $20\ \text{g.l}^{-1}$

200 mM TRIS: $24,22\ \text{g.l}^{-1}$

0,2% PNP-beta-D-glukopyranosid: $2\ \text{mg.l}^{-1}$

2% Na_2CO_3 : $20\ \text{g.l}^{-1}$

0,3 M ZnSO_4 : $86,262\ \text{g.l}^{-1}$

0,3 M Ba(OH)_2 : $94,644\ \text{g.l}^{-1}$

PNP cellobiosid: $1\ \text{mg.ml}^{-1}$

PNP glykosid: $2\ \text{mg.ml}^{-1}$

1M NaCl: 58g/l

0,2% kongo červeň: $2\ \text{g.l}^{-1}$

0,5% substrát: $5\ \text{g.l}^{-1}$ (pektin, CMC, škrob, azokasein, inulín, sonikovaný xylan, koloidní chitin)

Lugolův roztok: KI $10\ \text{g.l}^{-1}$

$\text{I}_2\ 5\ \text{g.l}^{-1}$

1% tributyrin: 1 ml do 100 ml H_2O

50mM CaCl_2 : $5,55\ \text{g.l}^{-1}$

2,5% agar: $25\ \text{g.l}^{-1}$

0,2% PNP-acetyl- β -D-glukosaminid: $2\ \text{g.l}^{-1}$

3.5 Analytické metody:

3.5.1 Stanovení proteinů (BRADFORD 1976)

Metoda je založena na změně absorpčního maxima Coomasie Brilliant Blue G-250 z vlnové délky 465 nm na vlnovou délku 595 nm. Tento indikátor existuje ve dvou barevných formách, modré a červené. V kyselém prostředí dochází k interakci mezi Coomasie Brilliant Blue G-250 a bílkovinou. Díky tomu je pomocí iontových a hydrofobních interakcí stabilizována aniontová forma Coomasie Brilliant Blue G-250.

Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 0,004 ml ředěného enzymového extraktu a 0,2 ml pracovního roztoku (1 objem roztoku A + 8 objemů destilované vody). Reakční směs byla promíchána a po 5 min (ponecháno při pokojové teplotě) byla intenzita vzniklého modrého zabarvení měřena při vlnové délce 595 nm pomocí spektrometru Sunrise Tecan. Obsah proteinu bylo stanoveno odečtením z kalibrační křivky v rozsahu 0 - 2 mg.ml⁻¹. Jako standard byl použit roztok BSA v destilované vodě. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních.

4.5.2 Stanovení aktivity enzymů celulózy, xylanázy, fruktunázy, pektinázy, amylázy, chitinázy (LEVER 1977)

Metoda je založena na měření přírůstku koncentrace redukujících skupin v hydrolyzátu polysacharidu.

Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného enzymového extraktu, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu. Použité substráty pro jednotlivé enzymy jsou uvedeny v tabulce XII. Suspenze byla promíchána a inkubována při teplotě 40 °C po dobu 60 min. Slepé vzorky obsahující stejnou směs nebyly inkubovány a reakce byla ihned zastavena přidáním 0,4 ml ZnSO₄ a 0,4 ml Ba(OH)₂. Směs byla promíchána a stočena v centrifuze po dobu 10 min při 4000 ot.min⁻¹. Po ukončení inkubace byly vzorky ošetřeny stejným způsobem. Do nově připravených zkumavek bylo napipetováno 0,2 ml dH₂O, 0,1 ml odstředěného supernatantu a 0,9 ml čerstvě připraveného činidla PAHBAH. Roztok byl promíchán a inkubován při teplotě 100 °C po dobu 10 min. Extinkce roztoku byla měřena ve spectrometru při vlnové délce 410 nm. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních.

Ke kalibraci byla použita ředící řada roztoků viz. tab. XII.

Tab. XII: Typ substrátu, roztoku a rozsahu kalibrace

Enzym	Substrát	Roztok kalibrace	Rozsah $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Celuláza	CMC (karboxymetyl celulóza)	CMC (karboxy metyl celulóza)	0 - 100
Xylanáza	CM xylan (karboxymetyl xylan)	CM xylan (karboxymetyl xylan)	0 - 100
Fruktunáza	inulín	inulín	0 - 100
Pektináza	pektin	kyselina galakturonova	0 - 100
Amyláza	škrob	škrob	0 - 100
Chitináza	koloidní chitin	N-acety-glukosamin	0 - 100

3.5.3 Stanovení proteázové aktivity (KOPĚČNÝ; WALLACE 1982)

Metoda je založena na měření aktivity proteas, která je úměrná množství uvolněných barevně značených aminokyselin z azokaseinu. Aktivita enzymu je odvozena od absorbance enzymu, která je měřena při vlnové délce 440 nm.

Do zkumavek bylo napipetováno 0,2 ml vhodně zředěného vzorku, 0,4 ml fosfátového pufru a 0,1 ml substrátu. Jako substrát byl použit roztok azokaseinu. Suspenze byla promíchána a inkubována při teplotě 40 °C po dobu 60 min. Slepé vzorky, obsahující stejnou směs, nebyly inkubovány a reakce byla ihned zastavena přidáním 0,2 ml 25% kyseliny trichloroctové. Po ukončení inkubace byla reakce ukončena stejným způsobem. Extinkce roztoku byla měřena při vlnové délce 440 nm pomocí spektrofotometru Thermo Spectronic. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Jako kalibrace byl použit roztok azokaseinu v rozsahu 0 - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.5.4 Stanovení aktivity β -glukosidázy (SAHA A KOL. 1996) a N-acetylglukosaminidázy (BIDOCHKA A KOL. 1993)

Metoda je založena na měření přírůstku uvolněného žlutého p-nitrofenolu.

Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného enzymového extraktu, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu. Použité substráty pro jednotlivé enzymy jsou uvedeny v tabulce XIII. Suspenze byla promíchána a inkubována při teplotě 40 °C po dobu 60 min. Slepé vzorky obsahující stejnou směs nebyly inkubovány a reakce byla ihned zastavena přidáním 0,8 ml 2% Na₂CO₃. Po ukončení inkubace byla reakce ukončena stejným způsobem. Extinkce roztoku byla měřena při vlnové délce 410 nm pomocí spektrofotometru Thermo Spectronic 5. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Ke kalibraci byla použita ředící řada roztoků viz. tab. XIII.

Tab XIII: Typ substrátu, roztoku a rozsahu kalibrace

Enzym	Substrát	Roztok kalibrace	Rozsah $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
β -glukosidáza	PNP- β -D-glukopyranosid	p-nitrofenol	0 – 0,3
N-acetylglukosaminidáza	PNP-acetyl- β -D-glukosaminid	p-nitrofenol	0 – 0,3

3.5.5 Stanovení aktivity celobiohydrolazy (DESHPANDE A KOL. 1984)

Metoda je založena na měření přírůstku uvolněného žlutého p-nitrofenolu.

Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného enzymového extraktu, 0,1 ml pufru, 0,1 ml laktonu kyseliny glukuronové a 0,1 ml substrátu. Jako substrát byl použit roztok PNP- β -D-glukopyranosidu. Suspenze byla promíchána a inkubována při teplotě 40 °C po dobu 60 min. Slepé vzorky obsahující stejnou směs nebyly inkubovány a reakce byla ihned zastavena přidáním 0,8 ml 2% Na₂CO₃. Po ukončení inkubace byla reakce ukončena stejným způsobem. Extinkce roztoku byla měřena při vlnové délce 410 nm pomocí spektrofotometru Thermo Spectronic 5. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Ke kalibraci byla použita ředící řada roztoku p-nitrofenolu ve vodě v koncentracích 0 - 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.5.6 Stanovení lipázy miskovou metodou (SMELTZER A KOL. 1992)

Metoda je založena na pozorování zóny projasnění na agarové misce v důsledku rozkladu substrátu. Jako substrát byl použit tributyrin, jako standard sloužil roztok lipázy (zdroj *Candida rugosa*, Sigma, USA) o aktivitách v rozmezí 0 - 10 U. μl^{-1} . Roztok 1% tributyrinu (sonikace 3 min) byl smíchan s roztokem 200mM TRIS - 50 mM CaCl₂ - 2,5% agaru v poměru 1:1 a nalit do Petriho misek. Po zatuhnutí bylo v miskách sterilně vytvořeno 7 jamek, do každé jamky bylo napipetováno 65 μl enzymového extraktu. Misky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 4 hod. Poté byl odečten průměr zóny projasnění. Koncentrace byla odečtena z kalibrační křivky.

3.6 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (LAEMMLI 1970)

Základní roztoky:

A – 30 g akrylamidu, 0,8 g N,N'-metylenbisakrylamidu, doplnit do 100 ml vodou.

B – 10 g SDS, doplnit do 100 ml vodou

C – 9,1 g TRIS rozpustit v 50 ml vody, dotitrovat konc. HCl na pH 8,8 (asi 0,97 ml), doplnit do 100 ml vodou

D – 3 g TRIS rozpustit v 50 ml vody, dotitrovat HCl na pH 6,8 a doplnit do 100 ml vodou

E – 30,3 g TRIS, 144 g glycinu, 10 g SDS, doplnit do 1 l vodou

F – 10 mg bromfenolové modři rozpustit v 1 ml roztoku D

G – 1 g persíranu amonného doplnit do 10 ml vodou

I – Zaostrovací gel: 1 ml A, 5, ml D, 0,1 ml B, 3,8 ml H₂O, 5 μl TEMED, 0,15 ml G

J – Vzorkový pufr (neredukující): 2,4 ml D, 2 ml B, 1 ml glycerolu, 4,4 ml H₂O, 0,1 ml F

K – Vzorkový pufr (redukující): 2,4 ml D, 2 ml B, 1 ml glycerolu, 4 ml H₂O, 0,1 ml F a 0,5 ml merkaptoetanolu

L – Ekvilibrační roztok: 25 ml C, 24,5 ml H₂O a 0,5 ml B (SDS)

M – Elektrodový pufr: 100 ml E a 900 ml H₂O

N – Batrvící roztok 450 ml etanolu, 100 ml kyseliny octové, 450 ml H₂O,
0,5 g Coomassie Blue R-250, 2,5 ml formaldehydu

O – Odbarvovací roztok: 250 ml etanolu, 100 ml kyseliny octové, 650 ml H₂O, 3% glycerolu, 0,5 % formaldehydu

Do sestavených desek byl nalit po vyznačenou rysku separační gel (Tab. XIX), který se převrstvil isobutanolem nasyceným roztokem C. Gel se nechal zpolymerovat ve vodorovné poloze minimálně 1 hodinu. Z povrchu se poté odsál isobutanol a gel se ekvilibroval roztokem L po dobu 30 min. Po odsátí roztoku L se uvolněný prostor zalil zaostřovacím gelem a do desky se zasunul hřebínek. Poté co zaostřovací gel zpolymeroval, se desky připevnilly k chlazenému korpusu a horní anodová nádobka se naplnila čerstvým elektrodovým puřrem M. Elektrodovým puřrem M byl naplněn i dolní katodový prostor. Vzorky se nanesly podvrstvením do jamek po hřebínku. Před nanesením se vzorky po ředění redukujícím vzorkovým puřrem povařily po dobu 2 min. Jako standart byl použit Roti Mark Standart (celkové proteiny, Německo) nebo Kaleidoscope standart (zymogramy, BioRad, USA) (14,5 – 200 kDa). Napětí 35 V se nastaví v úvodu a poté po dosažení konce zaostřovacího gelu je možné napětí zvýšit na 150 V. Gely po separaci byly pro vizualizaci proteinů barveny Commassie blue, gely použité pro zymogramy byly nejprve renaturovány a inkubací vyvíjeny.

Přehled použitých barviv je uveden v Tab. XV.

Tab. XIX: Složení separačního gelu

Roztoky	Objem	10% gel
A – Akrylamid	ml	10
B – SDS	ml	0,3
C – TRIS pH 8,8	ml	15
dH ₂ O se substrátem	ml	4,4
TEMED	μl	20
G - Persíran	ml	0,3

Tab. XV: Typ barvení gelů

Identifikace proteinů	Substrát	Typ barvení
Celkové proteiny	Gel bez substrátu	Commassie blue
xylanázy	0,5 % CM-xylan	Kongo červeně
celulózy	0,5 % CMC	Kongo červeně
amylázy	0,5 % škrob	Lugolův roztok
Chitinázy	0,5 % CM-chitin	Kongo červeně
pektinázy	0,5 % pektin	Kongo červeně

3.6.1 Zymografie (FLINT A KOL. 1994)

Pro vizualizaci izoenzymů byla použita výše uvedená technika elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Při přípravě PAG se přidá podle sledované enzymové aktivity odpovídající substrát, který je po ukončení gelu a následné renaturaci a inkubaci gelu v místech aktivních enzymových bandů štěpen a následně vizualizován. Renaturace se provádí opakovaným promýváním (3 x 15 min) gelu v 1% Tritonu X-100 (1 x) a 50 mmol.l⁻¹ fosfátovém pufru (pH 6) ředěným 1:1 dH₂O (2x). Po 1-4 hod. inkubaci při 40 °C v tomto pufru se gel vizualizuje dle tab. XV. (15 min 0,1% Kongo červeně a poté odbarví 1M NaCl.)

Barvení kongo červeně

Po renaturaci byl gel inkubován 1 hod v tom samém pufru při teplotě 37°C a poté obarven 0,2% roztokem kongo červeně 20 minut. Odbarven byl gel v roztoku 1M NaCl po dobu 2 x 10 minut. Pro lepší identifikaci byl gel dobarven v roztoku 0,5% kyseliny octové (gel se obarvil modře a zvýraznily se kontrasty).

Barvení Commassie blue

Gel byl barven 2 hod roztokem N a poté odbarven 2 hod roztokem O.

Barvení roztokem jódu (EISENTHAL; DANSON 2002)

Po renaturaci byl gel inkubován 2 hod v tom samém pufu při teplotě 37°C a poté obarven přidáním 25 ml Lugolova roztoku.

3.7 Statistické vyhodnocení

Výsledky měření jsou prezentovány jako průměry a směrodatné odchylky hodnot výběru o četnosti $n=12, 11, 8$ pro lokality A, B, C. Významnost rozdílů mezi hodnotami byla analyzována pomocí jednocestné ANOVA metody (ODA A KOL. 1991). V případě signifikantního rozdílu byl proveden Studentův t-test (SNEDECOR; COCHRAN 1967). Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu GraphPad Prism v. 5.04 (GraphPad Software, USA).

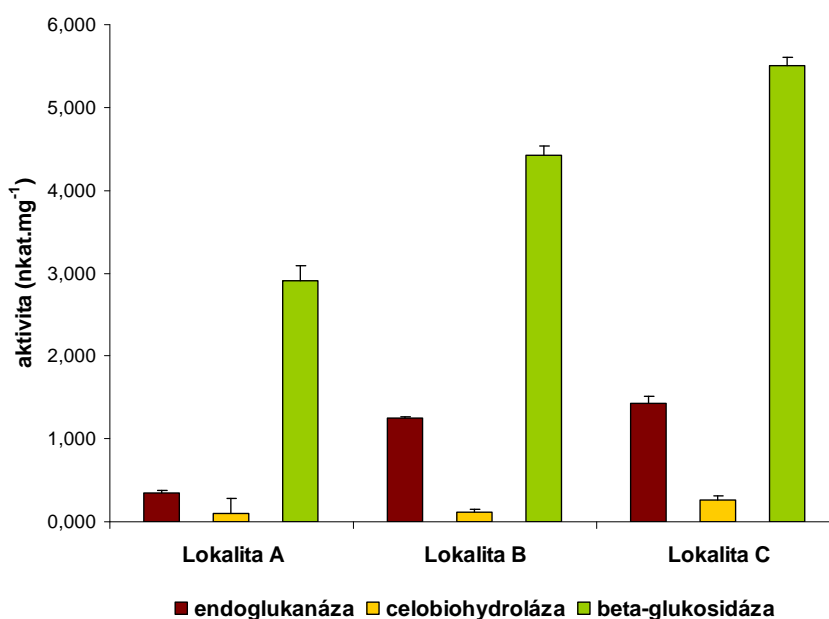
4. Výsledky

4.1 Aktivita hydrolytických enzymů v bachoru srnčí zvěře

4.1.1 Aktivita enzymů účastnících se degradace celulózy:

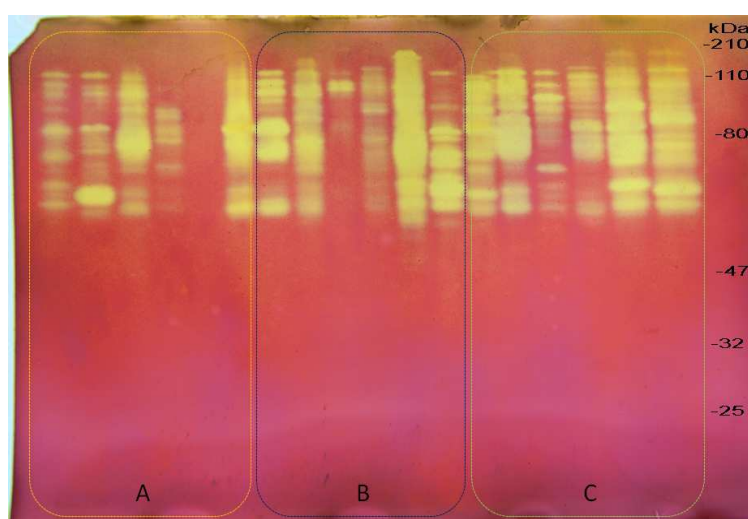
Specifická aktivita enzymů endoglukanázy, celobiohydrolázy a β -glukosidázy byla testována v 31 vzorcích pocházejících z bachorového obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C. V lokalitě A bylo testováno celkem 12 vzorků, v lokalitě B 11 vzorků a v lokalitě C 8 vzorků. Na grafu 4 jsou znázorněny průměrné aktivity sledovaných enzymů v jednotlivých lokalitách. Nejvyšší aktivity byly zaznamenány v lokalitě C. Endoglukanázová aktivita byla $1,426 \pm 0,183$ nkat.mg⁻¹, v lokalitě B $1,253 \pm 0,186$ nkat.mg⁻¹, zatímco v lokalitě A pouze $0,339 \pm 0,044$ nkat.mg⁻¹. V případě celobiohydrolázy byly zjištěny aktivity $0,091 \pm 0,012$ nkat.mg⁻¹ v lokalitě A, $0,120 \pm 0,021$ nkat.mg⁻¹ v lokalitě B, zatímco v lokalitě C byla aktivita více než dvojnásobná ($0,271 \pm 0,012$ nkat.mg⁻¹). Aktivita β -glukosidázy byla ve všech lokalitách nejvyšší: $2,903 \pm 0,079$ nkat.mg⁻¹ (lokalita A), $4,425 \pm 0,049$ nkat.mg⁻¹ (lokalita B) a $5,514 \pm 0,09$ nkat.mg⁻¹ (lokalita C).

Graf 4: Specifická aktivita celulolytických enzymů endoglukanázy, celobiohydrolázy a β -glukosidázy v bachorovém obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C (nkat.mg⁻¹).



Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v aktivitách celobiohydrolázy jsou významné na hladinách $P < 0,05$. Rozdíly v aktivitách β -glukosidázy a endoglukanázy byly ve všech případech statisticky nevýznamné.

Obr. 12: Zymogram celulytické aktivity ve vzorcích bachorového obsahu srnčí zvěře z lokality A, B a C detekované denaturační SDS-PAGE na 10% gelu obsahujícím karboxymethylcelulózu. Aktivita celuláz byla vizualizovaná barvením pozadí Kongo červení.



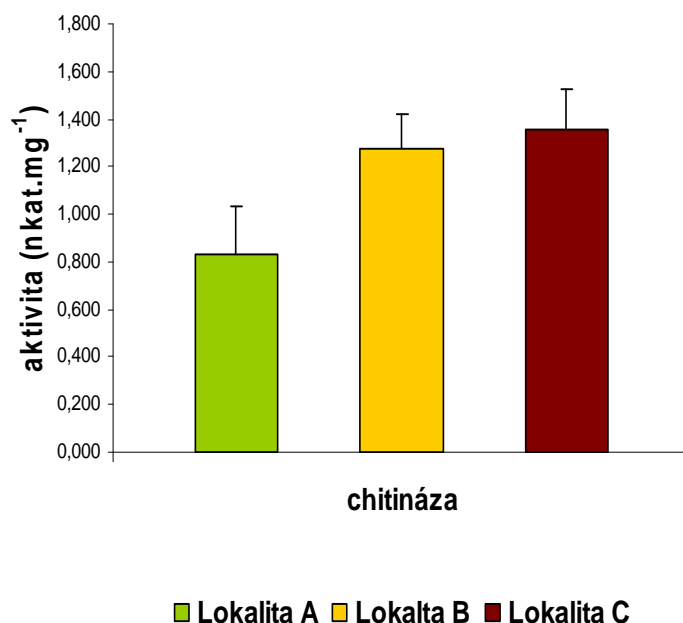
Aktivita celuláz detekovaná pomocí jejich schopnosti hydrolyzovat karboxymethylcelulózu je zřejmá na zymogramu na obrázku 12. Z počtu a intenzity aktivních bandů je zřejmé, že v jednotlivých vzorcích se nachází velmi rozdílné spektrum celulázové aktivity. Lze konstatovat, že ve vzorcích pocházejících ze všech oblastí je většina velmi aktivních, s větším množstvím detekovaných izoenzymů, jejich molekulová hmotnost se pohybuje v intervalu přibližně 50 – 200 kDa.

4.1.2 Aktivita chitinolytických enzymů

Specifická aktivita chitinázy byla testována ve 31 vzorcích pocházejících z bachorového obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C. Na grafu 5 jsou znázorněny průměrné aktivity chitinázy v jednotlivých lokalitách. Srovnatelná aktivita chitinázy byla v lokalitách B a C ($1,278 \pm 0,142$ nkat.mg⁻¹, resp. $1,356 \pm 0,171$ nkat.mg⁻¹). V lokalitě A jsme zjistili významně nižší aktivitu ($0,830 \pm 0,202$ nkat.mg⁻¹).

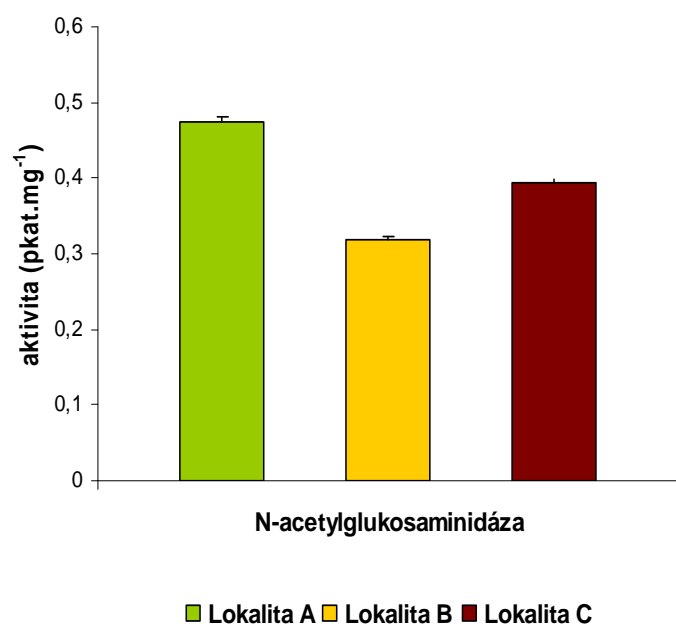
Pro stanovení specifické aktivity N-acetylglukosaminidázy bylo testována 31 vzorků pocházejících z bachorového obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C. Na grafu 6 jsou znázorněny průměrné aktivity N-acetylglukosaminidázy. Aktivity v jednotlivých lokalitách jsou srovnatelné: $0,394 \pm 0,005$ pkat.mg⁻¹ (lokalita C), $0,475 \pm 0,005$ pkat.mg⁻¹ (lokalita B) a $0,319 \pm 0,014$ pkat.mg⁻¹ (lokalita C).

Graf 5: Specifická aktivita chitinázy v bachorovém obsahu srnčí zvěře odebraného v lokalitách A, B a C (nkat.mg⁻¹)



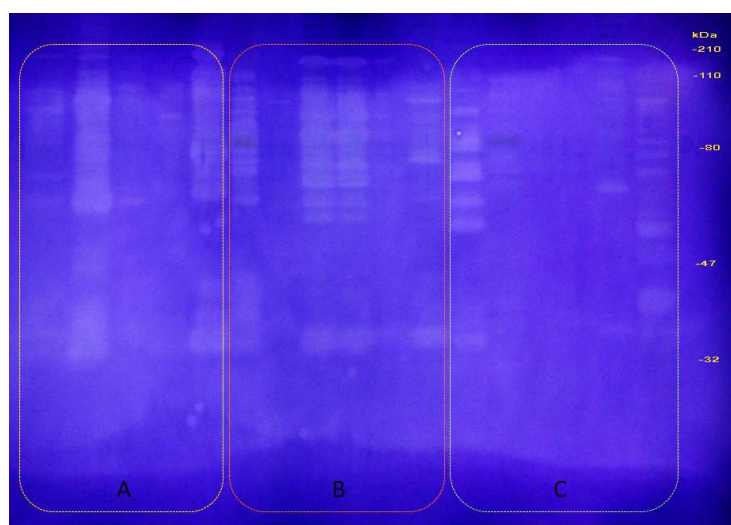
Rozdíly v aktivitách chitinázy v jednotlivých lokalitách nebyly statisticky nevýznamné.

Graf 6: Specifická aktivita N-acetylglukosaminidázy v bachorovém obsahu srnčí zvěře odebraného v lokalitách A, B a C (pkat.mg⁻¹)



Rozdíly v aktivitách N-acetylglukosaminidázy v jednotlivých lokalitách nebyly statisticky nevýznamné.

Obr. 13: Zymogram endochitinázové aktivity ve vzorcích bachorového obsahu srnčí zvěře z lokality A, B a C detekované denaturační SDS-PAGE na 10% gelu obsahujícím karboxymetylchitin.

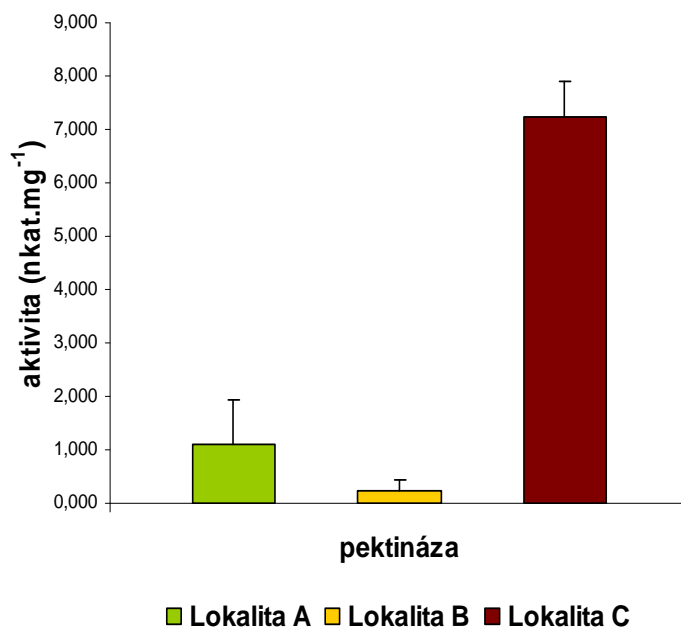


Chitinázová (endochitinázová) aktivita ve vzorcích bachorových obsahů byla vizualizovaná pomocí zymografie s CM chitinem (Obr. 13), která odhalila vysokou aktivitu endochitinázy v téměř všech testovaných vzorcích rozdělenou do několika aktivních izoenzymů. V počtech aktivních bandů jsou však mezi jednotlivými vzorky značné rozdíly. Molekulová hmotnost aktivních proteinů se pohybovala v intervalu 50-150 kDa.

4.1.3 Aktivita pektinázy

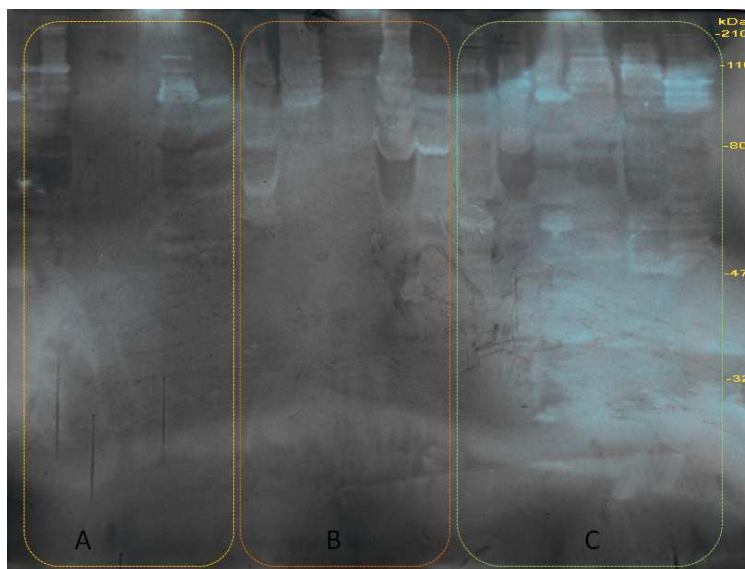
Specifická aktivita pektinázy byla testována v 31 vzorcích pocházejících z bachorového obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C. Na grafu 7 jsou znázorněny průměrné aktivity pektinázy v jednotlivých lokalitách. V lokalitě A byla naměřena aktivita $1,089 \pm 0,833 \text{ nkat.mg}^{-1}$, v lokalitě B $0,236 \pm 0,214 \text{ nkat.mg}^{-1}$, zatímco v lokalitě C byla aktivita pektinázy významně vyšší ($7,248 \pm 0,665 \text{ nkat.mg}^{-1}$).

Graf 7: Specifická aktivita pektinázy v bachorovém obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C (nkat.mg^{-1}).



Rozdíly mezi lokalitami A vs C a B vs C v aktivitách pektinázy byly na hladinách významnosti $P < 0,001$ statisticky velmi významné, rozdíl mezi lokalitou A vs B byl statisticky nevýznamný.

Obr. 14: Zymogram pektinolytické aktivity ve vzorcích bachorového obsahu srnčí zvěře z lokality A, B a C detekované denaturační SDS-PAGE na 10% gelu obsahujícím nativní pektin. Aktivita pektináz byla vizualizovaná barvením pozadí Kongo červení a graficky upravena ke zvýšení viditelnosti programem Image Lab verze 2.0 (BioRad, USA)

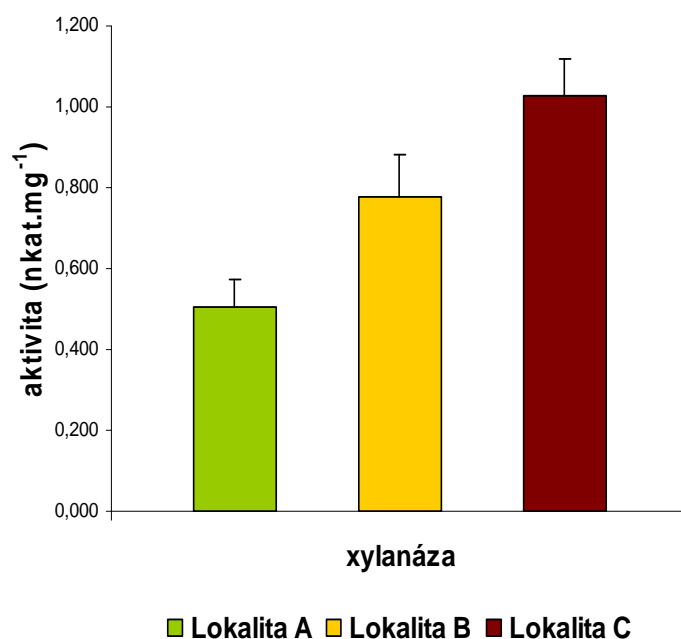


Spektrum proteinů s pektinolytickou aktivitou je zřejmé ze zymogramu na obrázku 14. Ve vzorcích ze všech oblastí lze prokázat přítomnost proteinů s pektinázovou aktivitou, jejich četnost a intenzita je výrazně vyšší ve vzorcích z lokality C. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v intervalu 50-200 kDa.

4.1.4 Aktivita xylanázy

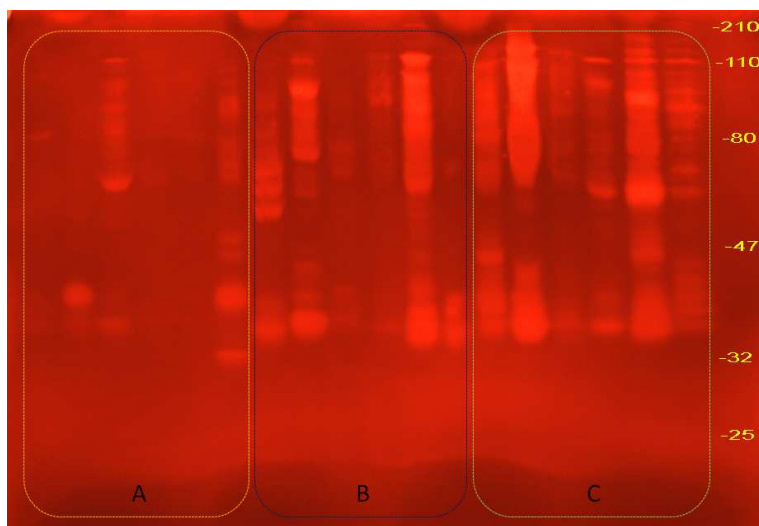
Specifická aktivita xylanázy byla testována v 31 vzorcích pocházejících z bachorového obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C. Na grafu 8 jsou znázorněny průměrné aktivity xylanázy v jednotlivých lokalitách. Aktivita xylanázy byla nejvyšší v lokalitě C, kde bylo zjištěno $1,027 \pm 0,09$ nkat.mg⁻¹. V lokalitě A byla zjištěna aktivita $0,507 \pm 0,066$ nkat.mg⁻¹ a o něco vyšší v lokalitě B $0,788 \pm 0,104$ nkat.mg⁻¹.

Graf 8: Specifická aktivita xylanázy v bachorovém obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C (nkat.mg⁻¹).



Rozdíly mezi lokalitami A vs B v aktivitách xylanázy jsou významné na hladinách $P < 0,01$, v ostatních případech jsou rozdíly statisticky nevýznamné.

Obr. 15: Zymogram xylanolytické aktivity ve vzorcích bachorového obsahu srnčí zvěře z lokality A, B a C detekované denaturační SDS-PAGE na 10% gelu obsahujícím karboxymetylxylan. Aktivita xylanáz byla vizualizovaná barvením pozadí Kongo červení.

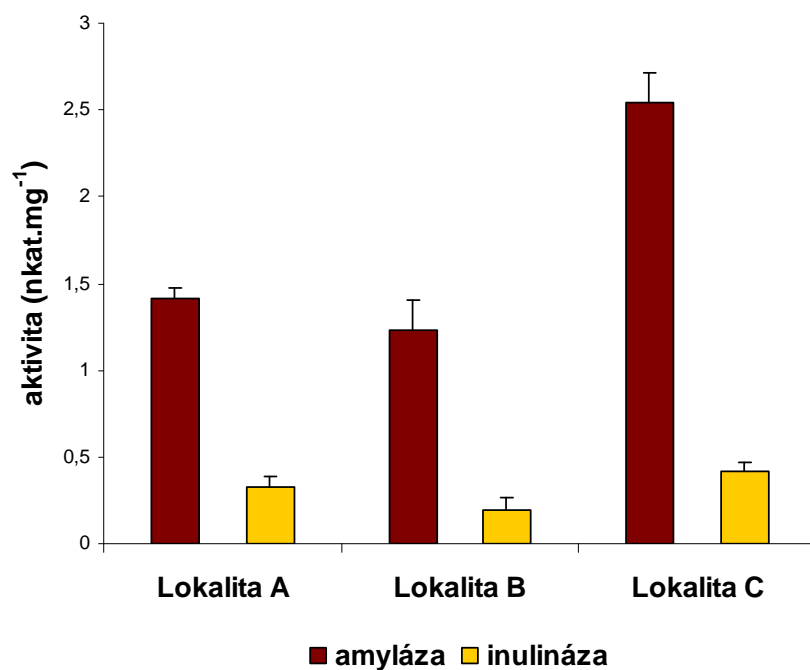


Velmi široké spektrum izoenzymů xylanáz je zřejmé na obrázku 15. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v širokém rozmezí přibližně 35-180 kDa. Intenzita bandů a jejich rozložení je velmi nehomogenní, zřetelně bohatší na xylanázovou aktivitu se však zdají vzorky odebrané v lokalitě C.

4.1.5 Aktivita amylázy a inulinázy

Specifická aktivita enzymů amylázy a inulinázy byla testována v 31 vzorcích pocházejících z bachorového obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C. Na grafu 9 jsou znázorněny průměrné aktivity sledovaných enzymů v jednotlivých lokalitách. Aktivita amylázy byla vyšší ve srovnání s inulinázou ve všech testovaných oblastech. Amylázová aktivita byla nejvyšší v lokalitě C ($2,539 \pm 0,172$ nkat.mg⁻¹), stejně tak i aktivita inulinázy ($0,412 \pm 0,06$ nkat.mg⁻¹). V lokalitách A i B byly aktivity obou enzymů nižší. Pro lokalitu A byla aktivita amylázy $1,416 \pm 0,055$ nkat.mg⁻¹ a inulinázy $0,321 \pm 0,062$ nkat.mg⁻¹. Pro lokalitu B byly detekovány aktivity $1,235 \pm 0,169$ nkat.mg⁻¹ (amyláza) a $0,189 \pm 0,072$ nkat.mg⁻¹ (inulináza).

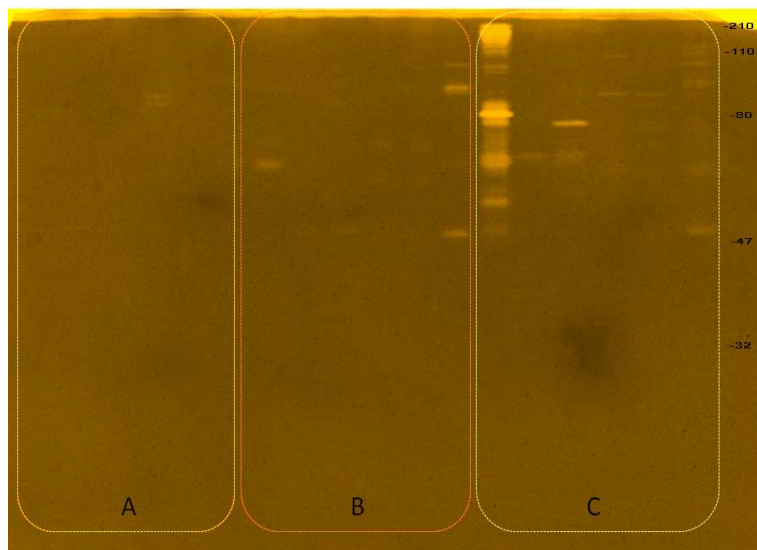
Graf 9: Specifická aktivita amylázy a inulinázy v bachorovém obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C ($\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$).



Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami A vs B a B vs C v aktivitách amylázy jsou velmi významné na hladinách $P < 0,01$. Ostatní rozdíly nejsou statisticky významné.

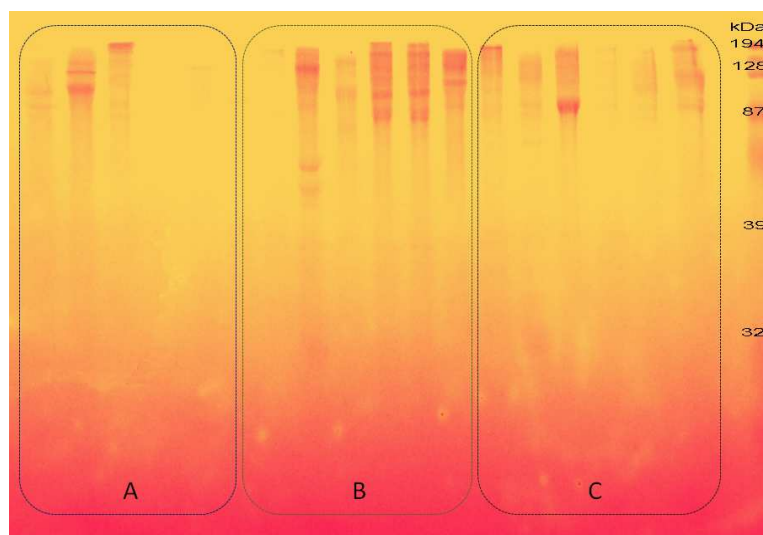
Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v aktivitách inulinázy jsou statisticky nevýznamné.

Obr. 16: Zymogram amylázové aktivity ve vzorcích bachorového obsahu srnčí zvěře z lokality A, B a C detekované denaturační SDS-PAGE na 10% gelu obsahujícím nativní rozpustný škrob. Aktivita amyláz byla vizualizovaná barvením pozadí 5% Lugolovým roztokem.



Na obrázku 16. je znázorněn zymogram pro amylotickou aktivitu. Detekovali jsme několik aktivních izoenzymů o různé molekulové hmotnosti i optické denzitně. Nejméně aktivních bandů jsme zjistili ve vzorcích z lokality A, naopak nejvíce bandů bylo detekováno v lokalitě C, jeden vzorek s dokonce výrazně vyšší denzitou bandů. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v intervalu 50-200 kDa.

Obr. 17: Zymogram inulináz ve vzorcích bachorového obsahu srnčí zvěře z lokality A, B a C detekované denaturační SDS-PAGE na 10% gelu obsahujícím nativní rozpustný inulin. Aktivita aktivních enzymů byla vizualizovaná po fixaci kyselinou octovou barvením pozadí TTC roztokem.

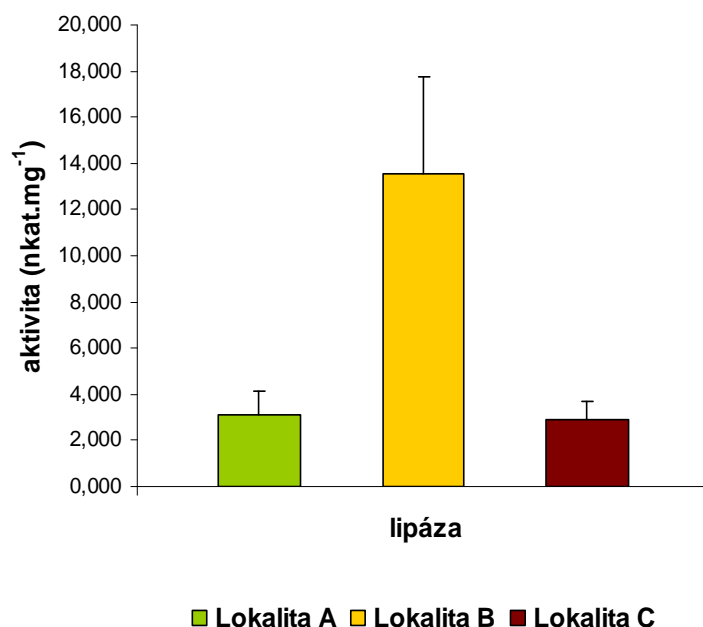


Zymogram na obrázku 17 znázorňuje nápadně četnou inulinázovou aktivitu s mnoha izoenzymy především ve vzorcích odebraných v lokalitě B. Zastoupení a rozložení bandů ukazuje na výraznou nehomogenitu inulináz v testovaných vzorcích. Molekulová hmotnost se pohybovala v rozmezí 60-195 kDa.

4.1.6 Aktivita lipázy

Lipolytická aktivita byla zjišťována miskovou metodou v 31 vzorcích pocházejících z bachorového obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C. Kalibrační křivka byla sestrojena s využitím roztoku komerční lipázy (zdroj *Candida rugosa*) o aktivitě v rozmezí 0 - 10 U. μl^{-1} . Na grafu 10 jsou znázorněny průměrné aktivity lipázy v jednotlivých lokalitách. Byla zjištěna významně vyšší aktivita v lokalitě B ($13,583 \pm 4,188 \text{ nkat.mg}^{-1}$). Aktivity v ostatních lokalitách byly srovnatelné. V lokalitě A byla aktivita $3,149 \pm 1,000 \text{ nkat.mg}^{-1}$ a v lokalitě B $2,871 \pm 0,806 \text{ nkat.mg}^{-1}$).

Graf 10: Specifická aktivita lipázy v bachorovém obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C (nkat.mg^{-1}).

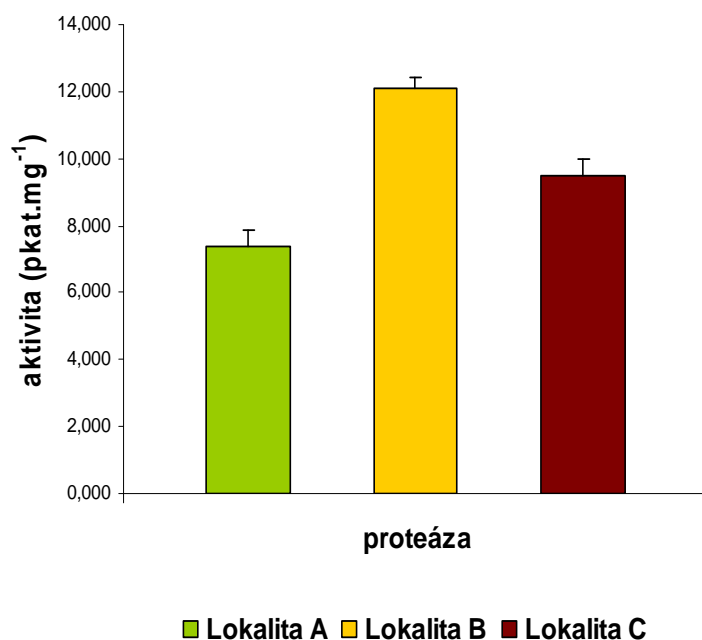


Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v aktivitách lipázy jsou statisticky nevýznamné.

4.1.7 Aktivita proteázy

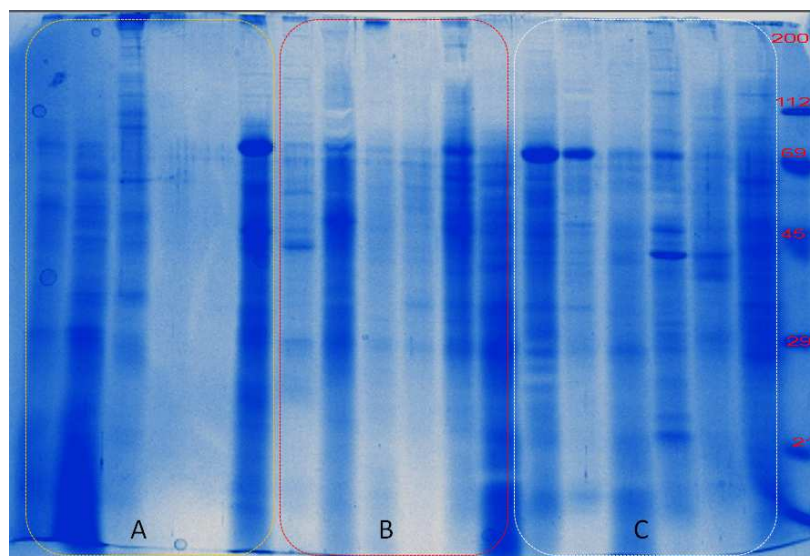
Proteázová aktivita byla testována v 31 vzorcích pocházejících z bachorového obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C. Na grafu 11 jsou znázorněny průměrné aktivity proteázy v jednotlivých lokalitách. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v lokalitě B ($12,088 \pm 0,072$ pkat.mg⁻¹), v ostatních lokalitách hodnoty významně nižší. V lokalitě B byla aktivita $9,519 \pm 0,466$ pkat.mg⁻¹, nejnižší hodnoty byly zaznamenány v lokalitě A ($7,376 \pm 0,468$ pkat.mg⁻¹).

Graf 10: Specifická aktivita proteázy v bachorovém obsahu srnčí zvěře z lokalit A, B a C (pkat.mg⁻¹)



Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v aktivitách proteázy jsou statisticky nevýznamné.

Obr. 18: ELFO PAGE celkových proteinů ve vzorcích bachorového obsahu srnčí zvěře z lokality A, B a C detekované denaturační SDS-PAGE na 10% gelu. Gel byl barven Coomassie Blue R-250.



Spektrum celkových proteinů rozdělených pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu je patrné na obrázku 18. Z elektroforegramu je patrná výrazná odlišnost a bohatost proteinového spektra v jednotlivých vzorcích. Detekované bandy se pohybují ve velmi širokém rozmezí molekulových hmotností od přibližně 7 do 200 kDa.

5. Diskuze

V této práci jsme se zabývali sledováním aktivit tří enzymů podílejících se na kompletní degradaci celulózy (endoglukanázy, celobiohydrolázy a β -glukosidázy). Ta je hlavní stavební složkou buněk tvořící strukturu rostlinných těl, které srnčí zvěři přijímá jako potravu. Nejvyšší aktivity všech celulolytických enzymů byly zaznamenány v lokalitě Bradlec. To je pravděpodobně způsobeno tím, že se zde zvěř přikrmuje lučným a vojtěškovým senem a také vysokým podílem ploch, které tvoří bývalé sady, zahrady a parcely, které nejsou zastavěny a nabízejí dostatek travin, které může zvěř využívat po celý rok. Naopak nejnižší aktivita celulolytických enzymů byla v lokalitě na pravém břehu Jizery, což bylo zřejmě způsobeno nadměrným přikrmováním jaderného krmiva, které zvěř preferovala před objemovým a také výskytem rozsáhlých polí s řepkou olejkou, která je pro ni velice atraktivní a obsahuje nižší podíl strukturní vlákniny a vyšší podíl tuků. Působením endoglukanázy je celulóza štěpena na kratší celodextriny. Ty, hromadící se v bachoru jsou dále rychle degradovány působením β -glukosidázy až na glukózu. Nízká aktivita celobiohydrolázy svědčí o tom, že štěpení celulózy na kratší řetězce, ze kterých je dále odštěpována glukóza je energeticky výhodnější než odštěpování cellobiosidů či cellotetrasidů.

Aktivita enzymů se mění v průběhu roku. Sezónními změnami celulolytické aktivity v bachoru srnčí zvěře se zabývali DEUTSCH a kol. (1998). Z jejich výsledků jsou zřejmé výrazně vyšší aktivity v jarním období pravděpodobně související s potravní nabídkou. Námi analyzované vzorky byly odebrány na konci roku. Ze zymogramu (Obr. 12) je patrná nehomogenita celulolytické aktivity v jednotlivých vzorcích bachorového obsahu pocházejícího z různých lokalit a dokonce i v jednotlivých lokalitách. Vzorky se liší v intenzitě jednotlivých bandů (výsledky denzimetrie nejsou prezentovány) i v počtu aktivních bandů v jednotlivých vzorcích svědčícím o rozdílném množství aktivních izoenzymů. Přestože je v literatuře popisováno několik hlavních celulolytických bakterií, zejména *Fibrobacter succinogenes* (Kobyashi a kol., 2008), s ohledem na velmi výraznou diverzitu mikrobiální populace bachorového ekosystému včetně celulolytických mikroorganismů lze rozdílnost v rozložení celulolytických enzymů v rámci sledovaného souboru očekávat.

Zabývali jsme se také aktivitou enzymů štěpící strukturní polysacharidy chitin, pektin a xylan. Ty jsou důležitou stavební složkou rostlinných organismů, resp. vyšších

hub. Na základě stanovených aktivit jednotlivých enzymů (chitináza, pektináza, xylanáza a N-acetyl- β -glukosaminidáza) je zřejmé, že zvěř v jednotlivých oblastech konzumovala rozdílnou skladbu potravy. V lokalitě C byla zjištěna vysoká pektinázová aktivita. To bylo pravděpodobně zapříčiněno přikrmováním krmnou řepou (vysoký obsah pektinu) a ovocnými výlisky. Pravděpodobně se zde projevila také konzumace ovoce, které má tamní zvěř zpřístupněné v neoplocených zahradách a na bývalé motokrosově dráze. Také na pravém břehu Jizery byla pektinázová aktivita nejvyšší v porovnání s chitinolytickou a xylonolytickou, nicméně nedosahovala takových hodnot jako v lokalitě Bradlec. To je pravděpodobně dáno tím, zvěř zde není přikrmována dužnatým krmivem. Naproti tomu na levém břehu Jizery byla zaznamenána nejvyšší aktivita chitinázy. Jednou z možností je, že zde zvěř konzumovala shnilé ovoce v bývalých sadech a nebo špatným skladováním krmiva, kterým byla srnčí zvěř přikrmována. Na zymogramech na obr. 13, 14 a 15 je patrná nehomogenita enzymů štěpící strukturní polysacharidy v různých lokalitách. Počty aktivních bandů a jejich výraznost svědčí o vyšší aktivitě jednotlivých izoenzymů pro všechny enzymy v lokalitě Bradlec, což je v souladu se stanovenými hodnotami specifických aktivit těchto enzymů.

Dostupná literatura je na informace o bachorové fermentaci u srnčí zvěře poměrně chudá, narazili jsme pouze na 2 práce pojednávající o sezónních změnách v intenzitě trávení (DEUTSCH A KOL. 1998; HOLLAND 1992). Vycházeli jsme proto spíše z analogie k hospodářským přežvýkavcům.

Při porovnání aktivity enzymů štěpící zásobní polysacharidy (amyláza, inulináza), je zřejmé, že bachorové mikroorganismy ve všechno lokalitách využívají polysacharid škrob. Hodnoty amylázové aktivity jsou v porovnání s inulinázovou aktivitou více než šestinásobné (resp. čtyřnásobné v lokalitě na pravém břehu Jizery). To je dáno nízkým výskytem inulínu v rostlinách, které preferují jako zásobná látku škrob. V oblasti Bradlec, kde je zvěř pravidelně přikrmována topinambury (obsahují vysoký podíl škrobu) je amylázová aktivita nejvyšší. Na obr. 16 (zymogram amylázová aktivita) je patrné, že aktivita amylázy je nejvyšší v lokalitě Bradlec. Pro ostatní oblasti je přítomnost jednotlivých izoenzymů velmi nízká, což ovšem může být způsobeno detekčním limitem pro vizualizaci amylázy touto technikou. Z obr. 17 je patrné, že různé formy inulinázové aktivity jsou nejvíce patrné v oblasti B, přestože při jednotlivých měření zde byly hodnoty specifické aktivity nejnižší.

Vysoká aktivita lipázy na levém břehu Jizery je dána pravděpodobně příkrmováním luštěninami, kukuřicí a řepným semínkem. V ostatních lokalitách nedosahuje takových hodnot, protože je zde pravděpodobně omezený přístup k potravě bohaté na tuky (lipidy).

Srovnatelná aktivita proteázy ve všech lokalitách poukazuje na to, že štěpení bílkovin jako základní složky potravy probíhá se stejnou měrou.

Na obr. 18 je znázorněno spektrum celkových proteinů a je patrné, že ve všech lokalitách jsou proteiny vysoce aktivní.

6. Závěr

Na základě získaných výsledků při řešení diplomové práce můžeme konstatovat, že cíle byly splněny. Podařilo se nám prokázat rozdílnost enzymových aktivit v lokalitách, které se liší především typem krajiny a potravní nabídkou.

Po porovnání výsledků byly prokázány rozdíly mezi hodnotami aktivit všech tří lokalit. S výjimkou lipázy a proteázy byla nejvyšší enzymová aktivita naměřena vždy v lokalitě Bradlec. Rozdíly hodnot mezi touto a ostatními lokalitami byly v některých případech velmi výrazné. Příčinou tohoto rozdílu byla pravděpodobně značná rozdílnost v potravní nabídce jednotlivých oblastí včetně úrovně myslivecké péče. Rozdíly mezi lokalitami A a B nebyly již tak výrazné.

Z mysliveckého, odborného i laického hlediska lze konstatovat, že nejlepší podmínky pro výskyt srnčí zvěře se nacházejí v lokalitě Bradlec, kde se nachází široká škála potravních příležitostí a aktivita bachorové fermentace odpovídá této substrátové pestrosti.

Pro mysliveckou praxi je důležité, aby v souladu s intenzivní zemědělskou činností byla zvěř příkrmována krmivem vyváženě bohatými na zásobní a strukturní polysacharidy, které by nahrazovaly potravní pestrost, která v krajině chybí. Větší množství kvalitní potravy zajistí dostatečně počty mikroorganismů potřebných k optimální bachorové fermentaci a tvorbě bílkovin, které jsou potřeba k optimálnímu vývoji.

7. Literatura

ABOU A. R., NADA A. K., HOWARD B. H. The Biochemistry of Rumen Protozoa 4. Decomposition of pectic substances *Biochemical Journal*, 1961, vol. 78, s. 512-517.

AN D., CAI S., DONG X. *Actinomyces ruminicola* sp. nov. isolated from cattle rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, vol. 56, s. 2043-2048.

ANONYMOUS 2011A: Seminář nejen o výživě. Stránka navštívena 2.3.2011. Dostupné z: http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Seminar-nejen-o-vyzive_s485x48788.html

ANONYMOUS 2011B: Beta-flukosidáza. Stránka navštívena 29.2. 2011. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-glucosidase>

ASAO N., USHIDA K., KOJIMA Y.: Proteolytic activity of rumen fungi belonging to the genera *Neocallimastix* and *Piromyces*. *Letter of Applied Microbiology*, 1993, vol. 16, s. 247-250.

ASPINALL G. O. Polysaccharides. 1970 Oxford: Pergamon Press.

BABIČKA C., HANÁK J., KNÁPEK M. Minerální doplňky srnčí zvěře. *Myslivost*, 2008 (8).

BAUCHOP T. Foregut fermentation. In: *Microbial Ecology of the gut*, Clarke R. T. J., Bauchop T., eds., p. 223-250, London, Academic Press. 2008.

BARTOŠ S. Mikrobiologie a biochemie trávení v batoru přežvýkavců. Academia, Praha. 1987, 9-44.

BIDOCHKA M. J., TONG K. I., KHACHATOURIANS G. G. Partial purification and characterization of two extracellular N-acetyl-D-glucosaminidases produced by the

entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1993, vol. 39, s. 40-45.

BLACKBURN T. H., HOBSON P. N. Proteolysis in sheep rumen by whole and fractionated rumen content. *Journal of General Microbiology*, 1960, vol. 22, s. 272-281.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, s. 248 - 254.

BROCK F. M., FORSBERG C. W., BUCHANAN-SMITH J. G. Proteolytic activity of rumen microorganism and effect of proteinase inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, vol. 44, s. 561-569.

BRYANT M. P., N. SMALL. Characteristics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle. *Journal of Bacteriology*, 1956, vol. 72, s. 22-26.

BRYANT M. P., SMALL N. *Bacteroides ruminicola* nov. sp. and *Succinimonas amylolytica* the new genus and species? Species of succinic acid-producing anaerobic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1958, vol. 76, s. 15-23.

CAI S., LI J., HU F., Z., ZHANG K., LUO Y., JANTO B., BOISSY R., EHRLICH G., DONG X. *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, vol. 76, s. 3818-3824.

CIRNE C. G., DELGADO S. D., MARICHAMY S., MATTIASSON B. *Clostridium lundense* sp. nov., a novel anaerobic lipolytic bacterium isolated from bovine rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, vol. 56, s. 625-628.

COLEMAN G. S. Hydrolysis of fraction 1 leaf protein and casein by ruminal entodiniomorphid protozoa, *Journal of Applied Bacteriology*, 1983, vol. 55, s. 111-118.

COLEMAN G. S., KEMP P., DAWSON R. M. C. The catabolism of phosphatidyl-ethanolamine by the rumen protozoon *Entodinium caudatum* and its conversion into the *N*-(1-carboxyethyl)derivative. *Biochemical Journal*, 1971, vol. 123, s. 97-104.

ČERVENÝ J., KAMLER J., KHOLOVÁ H., KOUBEK P., MARTÍNKOVÁ N. Encyklopedie myslivosti, Ottovo nakladatelství: 2004, 592s.

DEHORITY B. A. Degradation and utilization of isolated hemicellulose by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1965, vol. 89, s. 1515-1520.

DEHORITY B. A. Characterization of several bovine rumen bacteria isolated with xylan medium. *Journal of Bacteriology*, 1966, vol. 91, s. 1724-1729.

DENMAN S., GANG-PING X., BHARAT P. Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* cellulase cDNA (*celA*) homologous to *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II, *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, s. 1889–1896.

DESHPANDE M. V., ERIKSSON K.E., PETTERSSON L.G. An assay for selective determination of exo-1,4,- β -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*, 1984, vol. 138, s. 481–487.

DEUTSCH A., LECHNER-DOLL M., WOLF G. A. Activity of cellulolytic enzymes in the contents of reticulorumen and caecocolon of roe deer (*Capreolus capreolus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology*, 1958, vol. 119, s. 925-930.

DEVILLARD E., BERA-MILLET C., FLINT H. J., SCOTT K. P., NEWBOLD C. J., WALLACE R. J., JOUANY J-P., FORANO E. Characterization of XYN10B, a modular xylanase from luminal protozoon *Polyplastron multivesiculatum*, with a family 22

carbohydrate-binding module, that binds to celuloza. *Biochemical Journal*, 2003, vol. 373, s. 495-503.

DRMOTA, KOLÁŘ, ZBOŘIL, Srnčí zvěř v našich honitbách, Grada: 2007, 256.

DUŠKOVÁ D., MAROUNEK M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, vol. 33, s 15-163.

EISENTHAL R., DANSON M. J. Enzyme assays, Practical Approach: 2002, 284 s.

FLINT H. J. The rumen microbial ecosystem – some recent developments. *Trends in Microbiology*, 1997, vol. 12, s. 483-488.

FLINT H. J., ZHANG J. X., MARTIN J. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Current Microbiology*, 1994, vol. 29, s. 129-143.

FOREJTEK P., VODŇANSKÝ M., MALEMA M., VEČEREK V. Správné ošetření a zdravotní posouzení ulovené zvěře, Středoevropský institut ekologie zvěře o.p.s.: 2009, 168s.

FORSBERG C. W., LOVELOCK L. K., KRUMHOLZ L., BUCHANAN-SMITH J. G. Protease activities of rumen protozoa. *Applied Environmental Microbiology*, 1984, vol. 47, s.101-110.

FRANDSON R.D. Anatomy and physiology of farm animals, Lea & Febiger: 1974, 494s.

GOODAY G. W. The ecology of chitin degradation, pp.387-440 in K.C. Marschall (Ed.): *Advances in microbial Ecology*, vol. II. Plenum Press, New York 1990.

HANZAL L., HROMAS J., KOVAŘÍK J., BLÁHOVEC B., VACH M., POLÁKOVÁ D., PONDĚLÍČEK J., HANÁK J., VOLÁNEK P.: Myslivecká encyklopedie (CD ROM). 2005.

HARFOOT C. G., HAZLEWOOD G. P. Lipid metabolism in the rumen In: Hobson, P.N. (Ed.), *The rumen microbial ecosystem*, Elsevier Applied Science Publishers, London, UK. 1988, 258-322.

HESPELL R. B., WHITEHEAD T. R. Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *Journal of Dairy Science.*, 1991, vol. 73, s. 3013-3022.

HOBSON P. N., MANN S. O. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *Journal of General Microbiology*, 1961, vol. 25, s. 227-240.

HOBSON P. N., M. MACPHERSON Amylase from *Clostridium butyricum* and a *Streptococcus* isolated from the rumen of the sheep. *Biochemical Journal*, 1952, vol. 52, s. 671-679.

HODROVA B., KOPECNY J., KAS J Cellulolytic enzymes of rumen anaerobic fungi *Orpinomyces joyonii* and *Caecomyces communis*. *Research in Microbiology*, 1998, vol. 149, s. 417-427.

HOLAND O. Winter digestive strategy of a concentrate selector in Norway: the European roe deer. *Canadian Journal of Zoology*, 1992, vol. 70, s. 1331-1335.

HOLUB A KOL. Fyziologie hospodářských zvířat, Státní zemědělské nakladatelství: 1969. 676s.

HUNGATE R. E. The rumen and its microbes. Academic Press, New York and London. 1966, 8-90s.

CHEN G., RUSSELL J. B. More monsin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. *Applied Environmental Microbiology* 1989, vol. 55, s. 1052-1057.

CHESSON A., FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation by rumen micro organisms. In *The Rumen Microbial Ecosystem* ed. Hobson, P.N. and Stewart, C.S. 1997, pp. 329±381. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Blackie Academic and Professional.

JOUANY J-P. Rumen ciliate protozoa: their multiple roles in the digestive tract of ruminants. *Endocytobiosis Cell Research*, 2006, vol. 17, s. 93-102.

KAMLER Přikrmování srnčí zvěře: Myslivost, 2009 (9).

KAMRA D. N. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 2005, vol. 89, s. 124-135.

KASPEROWICZ A., MICHALOWSKI T. Assessment of the fructanolytic activities in the rumen bacterium *Treponema saccharophilum* strain S, *Journal of Applied Microbiology*, 2002, vol. 92, s. 140-146.

KOBAYASHI Y., SHINKAI T., KOIKE S. Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinoegenes* is important in rumen fiber digestion – Review, *Folia Microbiologica*, 2008, vol. 53, s. 195-200.

KOLEKTIV AUTORŮ Koldův atlas veterinární anatomie, Grada, 1999, 704s.

KOPEČNÝ J., HODROVÁ B.: The effect of yellow affinity substance on cellulases of *Ruminococcus flavefaciens*, *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY* Volume: 25 Issue: 3 Pages: 191-196 Published: SEP 1997.

KOPEČNÝ J., HODROVÁ B. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi, *Letters in Applied Microbiology*, 1995, vol. 20, s. 312-316.

KOPEČNÝ J., WALLACE R. J. Cellular location and some properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, vol. 43, s. 1026-1033.

Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, s. 680-685.

LEVER M. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry*, 1977, vol. 81, s. 21-27.

LI X., CALZA R. E. Fractionation of cellulases from the ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188, 1991, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, s. 3331-3336.

LOWE S. E., THEODOROU M. K., TRINCI A. P. J. Cellulases and xylanases of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, vol. 53, s. 1216-1223.

MAROUNEK M., DUŠKOVÁ D. Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*, *Letters in Applied Microbiology*, 1999, vol. 29, s. 429-433.

MORÁVKOVÁ M. Okresní generel územního systému ekologické stability (OG ÚSES): nepsáno, Dep. MÚ Mladá Boleslav. 2001.

MOUNTFORD D. O., ASHER R. A. Production of alpha-amylase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, vol. 54, s. 2293-2299.

NAWANI N., KAUR J. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2000, vol. 206, s. 91-96.

NOVOTNÁ Z., PROCHÁZKA J., ŠIMUNEK J., FLIEGEROVÁ K. Xylanases of anaerobic fungus *Anaeromyces mucronatus*, *Folia Microbiologica*, 2010, vol. 55, s. 363-367.

ODA H., FUKUI H., HITOMI Y., YOSHIDA A. Alternation of serum lipoprotein metabolism by polychlorinated biphenyls and methionine in rats fed a soybean protein diet. *Journal of Nutrition*, 1991, vol. 121, s. 925-933.

ORPIN C. G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 1975, vol. 91, s. 249-262.

PANDEY A., CARLOS R., SOCCOL, SELVAKUMAR P., VANETE T., KRIEGER N., FONTANA J. D. Recent developments in microbial inulinases- Its production, properties, and industrial applications, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, vol. 81, s. 35-52.

RUSSELL J. B., WILSON D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science*, 1996, vol. 79, s. 1503-1509

SAHA B. C. AND BOTHAST R. J. Production, purification, and characterization of a highly glucose- tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*, *Applied of Environmental Microbiology*, 1996, vol. 62, s. 165-3170.

SAS USER'S GUIDE *Statistics*, 5 ed., SAS Institute, Inc., Cary, NC, 1985.

SHORTLAND F. B. The distribution of fatty acids in plant lipids. In *Chemical Plant Taxonomy*, ed. T.W. Swain. Academic Press, New York. 1963, 253-311.

SMELTZER M. S., HART M. E., IANDOLO J. J. Quantitative spectrophotometric assay for *Staphylococcal* lipase. *Applied and Environmental Microbiology* 1992, vol. 58, s. 2815-2819.

STEVENS C. E., HUME I. H. Comparative physiology of the vertebrate digestive system. Second edition. Cambridge University Press. 1995, 46-93.

ŠIMŮNEK J., HODROVÁ B., BARTOŇOVÁ H., KOPEČNÝ J. Chitinolytic bacteria of the mammal digestive tract. *Folia Microbiologica.*, 2001, vol. 46, s. 76-78.

ŠIMŮNEK J., TISHCHENKO G., ROZHETSKY K., BARTOŇOVÁ H., KOPEČNÝ J., HODROVÁ B. Chitinolytic enzymes from *Clostridium aminovalericum* T1: Activity screening and purification. *Folia Microbiologica*, 2004, 194-198.

TEUNISSEN M. J., DE KORT G. V. M., OP DE CAMP H. J. M., VOGELS G. D. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of anaerobic fungi from ruminant and nonruminant herbivores on different substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 1993, vol. 39/40, s. 177-189.

THEODOROU M. K., ZHU W.-Y., RICKERS A., NIELSEN B. B., GULL K., TRINCI A. P. Biochemistry and ecology of anaerobic fungi. In *The Mycota* Vol. VI. Human and animal relationships (D.H. Howard and D. Williams, eds). Springer-Verlag, Berlin.: 1996, s.265-296.

TRINCI A. P. J., DAVIES D. R., GULL K., LAWRENCE M. I., NIELSEN B. B., RICKERS A., OZKOSE E., THOMAS B. J., DAVIES D. R., GRIFFITH G. W., THEODOROU M. K. *Cyllamyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Canadian Journal of Botany*, 2001, vol. 79, s. 666-673.

VACH M. Srnčí zvěř, Silvestris: 1993, 408s.

VAN SOEST P. J. Nutritional Ecology of teh Ruminant. 2nd edn., Orvallis, OR: O&B Books. 1983.

VODŇANSKÝ M. Jak skutečně působí řepka ozimá na srnčí zvěř: Myslivost, 2008 (2).

VODRÁŽKA Z. Biochemie, Academia: , 1996, 476s.

WALLACE R. J., JOBLIN K. N. Proteolytic activity of rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiology Letters*, 1985, vol. 29, s. 19-25.

WAITE R., GORROD A. R. N. The comprehensive analysis of grasses. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 1959, vol. 10, s. 317-326.

WILMES P., BOND P. L. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in Microbiology* 2006, vol. 14, s. 92-97.

WINKELMAYER R., LEBERSORGER P., ZEDKA H., FOREJTEK P., VODŇANSKÝ M., VEČEŘEK V., MALENA M., NAGY J., LAZAR P. Hygiena zvěřiny, Středoevropský institut ekologie zvěře o.p.s.: 2005, 168s.

WOJCIECHOWICZ M.: Partial characterization of pectinolytic enzymes of *Bacteroides rumenicola* isolated from the rumen of a sheep. *Acta Microbiologica Polonica Series A* 1971, vol. 3, s. 45-56

ZABLOUDIL, KORHON Vliv vývoje prostředí a potravní nároky srnčí zvěře, *Myslivost*, 2010 (4).