Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Vliv formy zkrmované sóji na oxidační stabilitu vajec kura domácího

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Miroslav Studený

Obor studia: Výživa zvířat a dietetika

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Plachý, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv formy zkrmované sóji na oxidační stabilitu vajec kura domácího" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.6.2020 _____

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Vladimírovi Plachému, Ph.D. za odborné vedení a za velmi cenné rady a poznámky z dané problematiky, bez kterých bych se s výsledky experimentu potýkal jen velmi složitě. Dále bych chtěl vyjádřit poděkování Ing. Tomášovi Taubnerovi, Ph.D. za trpělivé vysvětlování metodiky, jež byla nástrojem pro výstupy našeho měření.

Vliv formy zkrmované sóji na oxidační stabilitu vajec kura domácího

Souhrn

Vzhledem k neustále se rozrůstající lidské populaci, dochází zároveň k navyšování poptávky po co nejlevnějších zdrojích makroživin. Díky relativně nízkým požadavkům na životní prostor nosnic v chovu představují vejce finančně dostupný zdroj kvalitních živin. Vejce sama o sobě obsahují kromě nasycených mastných kyselin i ty nenasycené. A právě vyšší obsah těchto nenasycených kyselin sebou přináší větší riziko oxidace tuků během skladování.

Peroxidace lipidů je proces, při kterém dochází k napadání molekul tuků radikály, přičemž tento proces vede ke vzniku sekundárních metabolitů, které mohou mít za následek zdravotní komplikace. Nejčastěji zkoumaným markerem této reakce je malondialdehyd (MDA).

Sója luštinatá (*Glycine max*) je čím dál tím rozšířenější potravinou, která je využívána jak pro lidskou potřebu, tak i pro výživu zvířat. Sója má díky obsahu makroživin, ale i antinutričních látek svá specifika. Oproti ostatním druhům luštěnin vykazuje velmi vysoký obsah tuku, a to až přes 20 %. Velikou výhodou je vysoký obsah esenciálních mastných kyselin, především kyseliny linolové.

Cílem této práce bylo zhodnotit, zdali obsah plnotučné extrudované sóji (PS) či sójových výlisků (SV) má později vliv na oxidační stabilitu vaječného žloutku, ve srovnání se sójovým extrahovaným šrotem (SEŠ) doplněným kyselinou linolovou podle norem.

Do experimentu bylo zahrnuto 120 nosnic hnědovaječného hybrida Dominant D 102 rozdělených do tří skupin. Nosnice byly v každé skupině rozděleny do čtyřech obohacených klecí.

Během snáškového cyklu probíhal sběr vzorků, a následně vyhodnocení ukazatelů užitkovosti a oxidační stability pomocí měření koncentrace MDA v kapalinovém chromatografu.

V žádným z ukazatelů užitkovosti nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami.

U zjišťování oxidační stability byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi skupinou PS a kontrolou. V tomto případě se hypotéza potvrdila. Naopak u sójových výlisků se hypotéza zamítla.

Z výsledků tedy vyplývá, že využití sójových výlisků ve srovnání se sójovým extrahovaným šrotem v dietě pro nosnice, nemá vliv na výslednou oxidační stabilitu. Naopak využití plnotučné sóji oxidační stabilitu snižuje.

Klíčová slova: oxidační stabilita, vejce, krmivo, sója, mastné kyseliny, nosnice

Influence of form of fed soybean on oxidative stability of laying hens eggs

Summary

Due to the constantly growing human population there is also an increasing demand for the cheapest possible sources of macronutrients. Because of the relatively low demands on the living space of laying hens in breeding, eggs represent an affordable source of quality nutrients. Eggs themselves contain, in addition to saturated fatty acids, also unsaturated ones. And it is the higher content of these unsaturated acids that carries a greater risk of oxidizing lipids during storage.

Lipid peroxidation is a process in which fat molecules are attacked by radicals, leading to the formation of secondary metabolites that can result in health complications. The most frequently investigated marker of this reaction is malondialdehyde (MDA).

Soybean (Glycine max) is increasingly more widespread and is used both for human needs and for animal nutrition. Soy is very specific due to the content of macronutrients as well as antinutritional substances. Compared to other types of legumes, it has a very high fat content, up to over 20 %. One of the great advantages is the high content of essential fatty acids, especially linoleic acid.

The aim of this work was to evaluate whether the content of full-fat extruded soybean or soybean pomace later affects the oxidative stability of egg yolk, compared to soybean extracted meal supplemented with linoleic acid according to standards.

The experiment included 120 laying hens of the brown-egg hybrid Dominant D 102 divided into three groups. The laying hens were divided into four enriched cages in each group.

During the laying cycle, samples were collected, followed by evaluation of performance and oxidative stability indicators by measuring the concentration of MDA in the liquid chromatograph.

No statistically significant difference between groups was demonstrated in any of the performance indicators.

In the determination of oxidative stability, a statistically significant difference was found between the extruded soybean group and the control group. In this case, the hypothesis was confirmed. On the contrary, the hypothesis was rejected for soybean pomace.

Thus, the results show that the use of soybean pomace in comparison with soybean extracted meal in the diet for laying hens does not affect the resulting oxidative stability. Conversely, the use of whole soy does reduce oxidative stability.

Keywords: oxidation stability, egg, feed, soybean, fatty acids, laying hen

Obsah

1 Úvod **7**

2 Vědecká hypotéza a cíle práce **8**

3 Literární rešerše **9**

3.1 Oxidační stres **9**

3.1.1 Peroxidace lipidů 10

3.2 Malondialdehyd (MDA) **12**

3.2.1 MDA in vivo toxicita 14

3.2.2 Metody detekce MDA 15

3.3 Sója luštinatá (*Glycine max*) **17**

3.3.1 Plnotučná sója 18

3.3.2 Sójové výlisky 21

3.3.3 Sójový extrahovaný šrot 21

3.4 Trávicí soustava kura domácího **23**

3.5 Snáška a snáškový cyklus nosnic **25**

3.6 Nutriční požadavky nosnic **27**

3.6.1 Energie 27

3.6.2 Tuk 27

4 Metodika **29**

4.1 Design experimentu **29**

4.1.1 Průběh experimentu 29

4.1.2 Krmné směsi 29

4.2 Laboratorní rozbory vaječných žloutků **30**

4.2.1 Chemické látky 30

4.2.2 Příprava chemikálií 30

4.2.3 Pracovní postup přípravy vzorků na analýzu 30

4.2.4 Chromatograf 31

4.2.5 UV-VIS spektrofotometr 31

4.2.6 Statistické a grafické zpracování dat 31

5 Výsledky **32**

6 Diskuze **37**

7 Závěr **43**

8 Literatura **44**

9 Samostatné přílohy ..... **IV**

1 Úvod

Vejce představují ve světě jednu z nejkonzumovanější potravin (King et al. 2012) s vysokou energetickou hodnotou pro člověka. Nehrají však roli pouze jako potravina sama o sobě, nýbrž jsou využívána jako nezbytná ingredience do mnoha vyráběných produktů kvůli svým nutričním i fyzikálním vlastnostem (Pop et al. 2013; Wang et al. 2017). Stejně tak představují zdroj vitaminů, minerálů a esenciálních aminokyselin (Antova et al. 2019). Vejce jsou kvalitním a relativně levným zdrojem bílkovin a tuků s obsahem jak nasycených, tak především nenasycených mastných kyselin (Ceylan et al. 2011). Mimo jiné je vaječná bílkovina považována za jednu z nejstravitelnějších bílkovin vůbec (Antova et al. 2019). A právě díky vyššímu obsahu PUFA (polynenasycené mastné kyseliny) ve vaječném žloutku jsou vejce podle Wanga et al. (2017) náchylnější k oxidaci. Tento proces je doprovázen změnou senzorických vlastností vajec a jejich konzumace může mít za následek různé zdravotní komplikace (Pop et al. 2013; Barriuso et al. 2013).

Proces oxidačního stresu zahrnuje napadání biomolekul jako jsou tuky nebo bílkoviny radikálovými částicemi. Výsledkem tohoto procesu mohou být až sekundární produkty, které dále poškozují organismus. Nejčastějším sekundárním produktem je malondialdehyd (MDA) (Ayala et al. 2014). Tento aldehyd je schopen v organismu tvořit s DNA tzv. adukty, jejichž formace v řetězci proteinů může mít za následek vznik mutací, které mohou vézt až k zániku buňky či propuknutí rakovinového bujení (VanderVeen et al. 2003). Vyšší koncentrace malondialdehydu je pozorována při celé řadě onemocnění jako je cukrovka (Horvath et al. 2003), poruchy kardiovaskulárního aparátu (Uchida 2000), ateroskleróza (Tamer et al. 2002) či preeklampsie (Yoneyama et al. 2002).

Sója luštinatá patří mezi luštěniny, nicméně svým velmi vysokým obsahem tuku (i přes 20 %) zcela vyčnívá. Sójový olej je bohatý na esenciální polynenasycené mastné kyseliny, především na kyselinu linolovou (kolem 51 %) (Gül et al. 2012). Vzhledem k příznivým účinkům n-3 a n-6 mastným kyselinám na organismus člověka (Criste et al. 2018) je tuk využíván především pro lidskou potřebu a odpad po této výrobě představuje hodnotné krmivo pro různé druhy zvířat (především pro monogastry). Tukování krmiva je v oblasti výživy nosnic běžnou praxí, nicméně obohacování vajec PUFA kyselinami sebou nese riziko nižší oxidační stability během skladování (Lund et al. 2008; Heydari et al. 2009; Gül et al. 2012; King et al. 2012).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Krmné sójové suroviny, jako je plnotučná extrudovaná sója a sójové výlisky, mají vliv na oxidační stabilitu vaječného žloutku.

Cíl práce: Srovnání oxidační stability vaječných žloutků získaných od nosnic krmených dietami obsahujícími plnotučnou extrudovanou sóju nebo sójové výlisky, ve srovnání s dietou se sójovým extrahovaným šrotem doplněnou kyselinou linolovou podle normy potřeby živin.

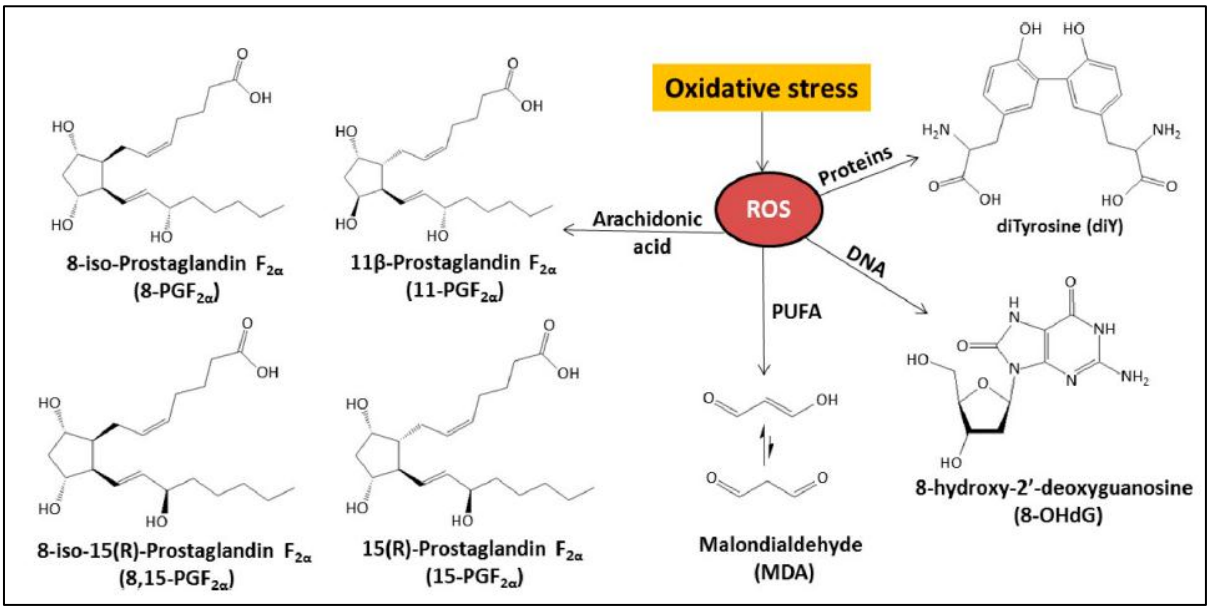
3 Literární rešerše

3.1 Oxidační stres

Oxidační stres popisuje situaci v organismu, kdy dochází k narušení přirozené rovnováhy mezi produkcí reakčních forem kyslíku nebo dusíku (zkráceně ROS, respektive RONS) a antioxidační kapacitou systému (Halliwell & Chirico 1993; Gutteridge 1995; Svobodová 2012; Ayala et al. 2014; Martinez & Kannan 2018). Uvnitř buňky dochází běžně k tvorbě těchto molekul, jakožto přirozené součásti metabolických procesů (Grotto et al. 2009). Oxidační stres je už několik let spojován nejen se stárnutím organismu, ale také s celou řadou závažných onemocněních (Del Rio et al. 2005), jako je například preeklampsie (Yoneyama et al. 2002; Ilhan et al. 2002), diabetes (Slatter et al. 2000; Dierckx et al. 2003; Martín-Gallán et al. 2003), různé formy rakoviny (Gönenc et al. 2001; Kolanjiappan et al. 2002; Manju et al. 2002; Bakan et al. 2002; Akbulut et al. 2003; Sander et al. 2003), reprodukční (Collodel et al. 2015) a jaterní problémy (Loguercio & Federico 2003; Aziz et al. 2015), leukémie (Bakan et al. 2003), kardiovaskulární onemocnění (Boaz et al. 1999; Uchida 2000; Polidori et al. 2002), Alzheimerová choroba (Delibas et al. 2002), centrální porucha sluchu (Ozden et al. 2002) nebo ateroskleróza (Tamer et al. 2002).

Tento proces může být způsoben nadměrnou produkcí radikálů nebo naopak nízkou hladinou antioxidantů nebo jejich aktivitou, či oběma situacím najednou (Grotto et al. 2009). Díky narušení této rovnováhy dochází k útokům radikálů na biomolekuly a signální dráhy organismu a tím i k jejich poškozování (Del Rio et al. 2005; Grotto et al. 2009; Svobodová 2012) a následné oxidaci (Martinez & Kannan 2018). Halliwell a Chirico (1993) uvádějí, že oxidační stres narušuje metabolismus buňky, poškozuje transportéry iontů v membráně či specifické proteiny a zvyšuje hladinu vápenatých iontů (Ca^{2+}). Tato situace vede k aktivaci proteáz a nukleáz, které se zaměřují na rozklad cytoskeletu, respektive fragmentaci DNA. Vznik jednotlivých biomarkerů během oxidačního stresu je znázorněno na Obrázku 1.

Nejčastější molekulou, na kterou se zaměřují ROS a RONS patří bezpochyby lipidy, konkrétně polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), jejichž oxidační degradací (peroxidací) se tvoří celá řada primárních, ale převážně nebezpečnějších sekundárních produktů. Kromě lipidů dochází k interakci i s nukleovými kyselinami, enzymy, proteiny a různými funkčními drahami uvnitř buňky (Del Rio et al. 2005; Grotto et al. 2009). Podle Ayaly et al. (2014) jsou hlavním zdrojem, potažmo místem vzniku těchto endogenních specifických molekul mitochondrie, peroxisómy, plazmatická membrána a endoplazmatické retikulum. Mezi nejdůležitější a zároveň nejagresivnější reaktivní formy kyslíku a dusíku patří superoxid (O_2^-), oxid dusnatý (NO), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($OH\cdot$), peroxynitrilový aniont ($ONOO^-$) a hydroperoxylový radikál ($HO_2\cdot$) (Gutteridge 1995; Grotto et al. 2009).



Obrázek 1: Schéma efektu oxidačního stresu biomolekul a následný vznik biomarkerů (Martinez & Kannan 2018)

3.1.1 Peroxidace lipidů

Lipidy se rozdělují do dvou skupin – polární a nepolární. Většinová část tukové tkáně v organismu je tvořena nepolárními tuky, které se vyskytují i v jiných typech buňkách, a které slouží jako zásobní zdroj energie pro savce. Naopak lipidy polární tvoří strukturu buněčných membrán a také organel uvnitř různých typů buněk. Tento typ lipidů je zodpovědný nejen za fluiditu buněčných membrán, nýbrž i za další její vlastnosti. Nejdůležitější součástí těchto membrán jsou bezesporu fosfolipidy. Jak již bylo řečeno, povaha buněčných a organelových membrán je zodpovědná za fyziologické vlastnosti a ovlivňuje především permeabilitu a polaritu (Ayala et al. 2014).

Podle Halliwela a Chirica (1993) patří peroxidace lipidů mezi nejpozorovanější radikálové řetězové reakce v biologii. Oxidace lipidů je často doprovázena charakteristickými strukturními, barevnými, ale i chuťovými a pachovými změnami (Gutteridge 1995; Barriuso et al. 2013). Tento proces vede nejprve k produkci primárních produktů – peroxidů, které jsou poté vystaveny specifickým podmínkám, což vede k produkci sekundárních produktů, mezi které patří nejčastěji ketony, aldehydy, hydroxysloučeniny, epoxidy, ale i oligomery a polymery. A právě tyto sekundární produkty oxidace mohou způsobovat či doprovázet různé problémy v organismu (Barriuso et al. 2013). Mezi nejnebezpečnější sekundární produkty oxidace peroxidů patří malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Barriuso et al. 2013). Grotto a kol. (2009) rovněž uvádí, že vznik konjugovaných dienů během peroxidace, odpovídá počátečním stádiím oxidačního stresu.

Peroxidace lipidů může probíhat dvěma způsoby – enzymaticky a neenzymaticky. Enzymatická peroxidace probíhá pod působením enzymů jako jsou lipoxygenázy,

cyklooxygenázy a také cytochrom P450. Neenzymatická cesta zahrnuje působení radikálů a specificky aktivních částic (Grotto et al. 2009).

Neenzymatická peroxidace se dělí na tři kroky – iniciaci, propagaci a terminaci (Ayala et al. 1993; Gutteridge 1995). Cílem působení je prostor mezi dvojnými vazbami v řetězci PUFA (na prvním schématu označen červeně), kde je přítomna methylová skupina, jejíž vodíky jsou náchylné k odštěpení. Vlivem tohoto napadení nejčastěji částicí OH· (na prvním schématu označen modře) dojde během iniciace k odštěpení jednoho atomu vodíku (Halliwel & Chirico 1993; Gutteridge 1995; Grotto et al. 2009; Ayala et al. 2014), který za sebou zanechá nespárovaný elektron na atomu uhlíku, což se celé označuje jako lipidový radikál (na prvním schématu označen zeleně). Naopak MUFA (mononenasycené mastné kyseliny) a nasycené mastné kyseliny jsou vůči napadání volnými radikály odolnější (Halliwel & Chirico 1993).

$$\mathbf{R{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}CH{-}R + HO\cdot \rightarrow R{=}CH{-}CH\cdot{-}CH{=}CH{-}R + H_2O}$$

Schematicky: L–H + HO· → L· + H_2O

Po tomto kroku následuje proces propagace, při kterém lipidový radikál reaguje s dvouatomovou molekulou kyslíku (O_2) a vznikne peroxylový radikál (LOO·).

$$\mathbf{L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot}$$

Peroxylový radikál může díky své nestabilitě reagovat s další molekulou PUFA a dát tak vzniku dalšímu lipidovému radikálu a lipidovému hydroperoxidu (LOOH).

$$\mathbf{LOO\cdot + L\text{-}H \rightarrow L\cdot + LOOH}$$

Nebo nastane situace, kdy přicházejí na řadu antioxidanty, které darují peroxylovému radikálu jeden elektron a tím se sníží jeho extrémní nestabilita, nebo dojde k reakci dvou radikálů a tím se řetězová reakce ukončí (Halliwel & Chirico 1993; Marnett 1999; Grotto et al. 2009; Ayala et al. 2014). Délka trvání této řetězové reakce je podle Marnetta (1999) závislá právě na koncentraci vitaminu E ve fosfolipidové dvojvrstvě.

V případě, chceme-li odhadnout či změřit rozsah samotné peroxidace, existují dle Halliwela a Chirica (1993) tři možnosti. Za prvé můžeme změřit úbytek PUFA, za druhé můžeme zjistit množství primárních produktů vzniklých během oxidace tuků a za třetí, můžeme zjistit množství sekundárních oxidačních produktů. Chemická podstata primárních,

ale i sekundárních produktů je závislá na složení mastných kyselin a také na přítomnosti kovů, konkrétně mědi (Cu) a železa (Fe).

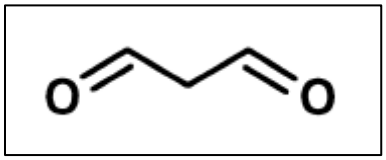
Většina těchto produktů oxidace tuků má velmi specifický zápach a díky své specifitě se dá určit, která PUFA právě podléhá oxidaci. Například propanal je typický marker pro oxidaci n-3 mastných kyselin a hexanal je naopak typický pro n-6 mastné kyseliny (Barriuso et al. 2013).

Jakmile dojde k produkci sekundárních produktů uvnitř buňky, může dojít buď ke smrti buňky nebo k jejímu přežití – záleží na okolnostech. V případě, že peroxidace dosáhla pouze nižší úrovně, je buňka schopna stimulovat svoji obranu skrze antioxidanty a regulovat oxidační stres. Pokud však peroxidace již dosáhla vyšší úrovně, než proti čemu je buňka schopna bojovat, nastane programovaná smrt – apoptóza (Ayala et al. 2014).

3.2 Malondialdehyd (MDA)

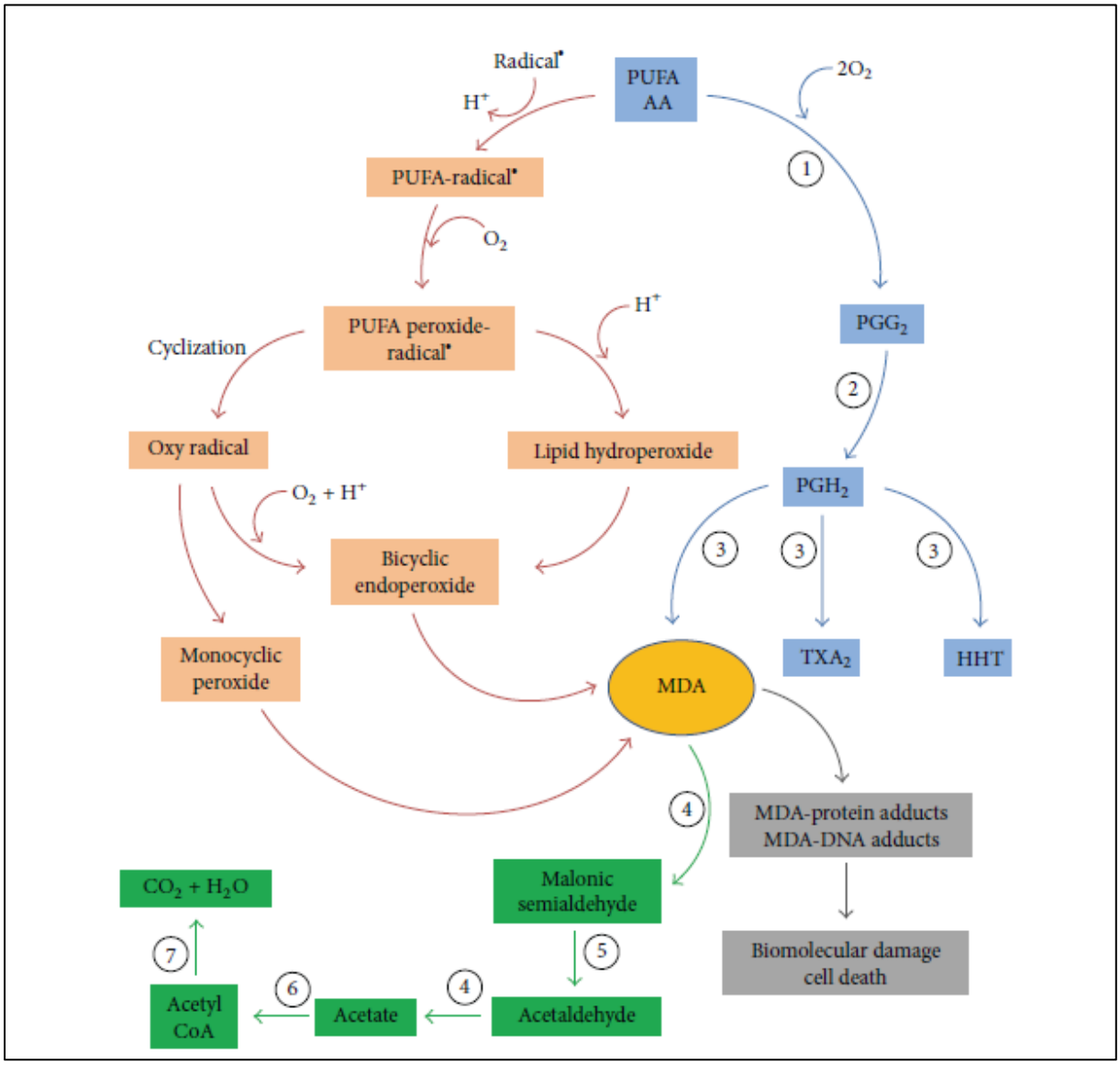
Jak již bylo řečeno v podkapitole 3.1.1 Peroxidace lipidů, patří MDA spolu se 4-hydroxynonenalem k hlavním sekundárním metabolitům peroxidace lipidů. MDA je rovněž nejčastěji využíván právě jako marker tohoto procesu (Barriuso & Astiasarán 2013; Ayala et al. 2014). Zatímco 4-HNE je považován za nejvíce toxický produkt, jehož toxicita spočívá pravděpodobně v reakci s thioly a aminoskupinami, MDA má naproti tomu spíše mutagenické a genotoxické účinky na organismus. Nebezpečí představují především interakce s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), konkrétně s nukleosidy a následné formování jejich aduktů (Marnett 1999; Ayala et al. 2014) a tato skutečnost může podle Grotta et al. (2009) vézt až k propuknutí rakovinového bujení.

Vlastnosti molekuly MDA ho činí těžko extrahovatelným, jelikož jeho molekula je malá, polární a také vysoce rozpustná ve vodě. Stejně tak je považována za relativně nestabilní (Grotto et al. 2009). Na strukturní vzorec malondialdehydu odkazuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Vzorec MDA (Uchida et al. 2000)

Schéma působení malondialdehydu je znázorněno na Obrázku 3. Metabolismus MDA začíná oxidací v mitochondriích za účasti aldehyd dehydrogenázy, po které následuje dekarboxylace a vznik acetaldehydu. Acetaldehyd je následně opět oxidován za pomoci aldehyd dehydrogenázy za vzniku acetátu a přes Acetyl-CoA až na CO_2 a H_2O (Ayala et al. 2014). Weismann a Blinder (2012) uvádějí, že během oxidačního stresu může interagovat MDA s acetaldehydem za vzniku jejich aduktů (MAA), které mají imunogenetické účinky na organismus. Další způsob odbourávání MDA představuje metabolizace cytoplasmatického MDA na methylglyoxal (MG), a poté až na D-laktát za účasti glukózy-6-fosfát isomerázy a dalších enzymů glyoxalázního systému. Během těchto reakcí zde vystupuje glukathion (GSH) jako kofaktor (Ayala et al. 2014).



Obrázek 3: Schéma metabolismu malondialdehydu. Modrá cesta znázorňuje jeho tvorbu během enzymatické peroxidace, naopak oranžová popisuje neenzymatickou cestu. Zelená barva značí enzymatické odoubávání až na CO_2 a H_2O a šedá barva znázorňuje interakci s DNA a následné poškození a smrt buňky (Ayala et al. 2014).

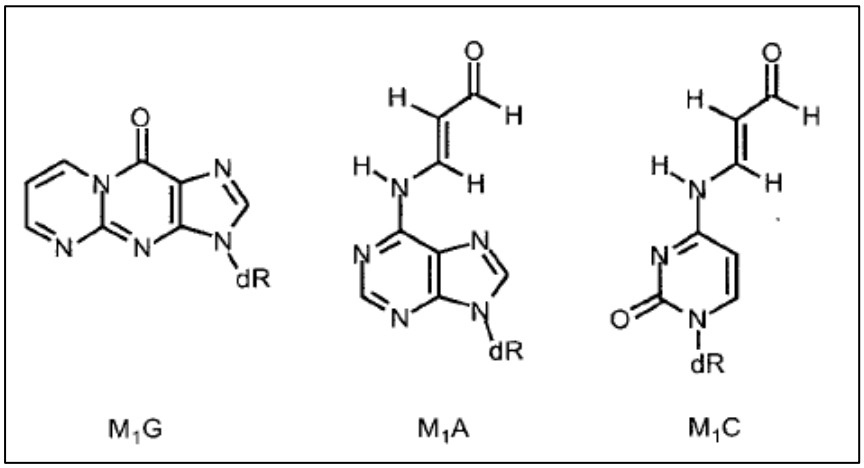
3.2.1 MDA in vivo toxicita

Reaktivita malondialdehydu je závislá na hodnotě pH. Při fyziologické hodnotě, která se pohybuje okolo 7 (neutrální) se MDA vyskytuje ve formě enolátového aniontu, jehož reaktivita není v tomto stavu vysoká. Jakmile však pH klesne pod hranici 7 a níže (kyselé), MDA se vyskytuje ve formě beta-hydroxyakroleinu a reaktivita stoupá (Del Rio et al. 2005; Ayala et al. 2014).

Malondialdehyd může reagovat se samotnými aminokyselinami či s celými proteiny a v těchto případech mohou vznikat Schiffovy báze, což je sloučenina vzniklá z reakce aminoskupiny (-NH_2) a aldehydové (-COH) nebo ketonové skupiny (-CO). Dalším úskalím reakce proteinů a MDA je změna fyziologických vlastností bílkovin. Tyto bílkoviny s pozměněnou strukturou se totiž stávají náchylnější k proteolýze a dochází rovněž ke změnám v propustnosti buněčných membrán (Ayala et al. 2014).

Proces odbourávání MDA zahrnuje i reakci, kdy dochází k hydrolýze na acetaldehyd. Tato reakce je podle Slattera et al. (2000) katalyzována přítomností aminokyselin lyzinu a argininu, nicméně zároveň dochází k tvorbě aduktů právě s těmito aminokyselinami. Rovněž uvádějí, že tyto AMK jsou jediné, které dokážou takto reagovat s MDA.

Podstatně větší problém představují interakce MDA s dusíkatými bázemi deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Hlavním produktem této reakce je nejčastěji pyrimido-[1,2-α]purin-10(3H-)one (M_1G), následovaný N^6-(3-oxo-propenyl)-deoxyadenosinem (M_1A) (viz Obrázek 4), který se však vyskytuje zhruba v pětinovém množství oproti M_1G. Mezi další adukty patří N^4-(3-oxopropenyl)-deoxycitidin (M_1C), jenž se vyskytuje podle Marnetta (1999) pouze ve stopovém množství.



Obrázek 4: Nejčastější produkty reakce MDA s dusíkatými bázemi (Niedernhofer et al. 2003)

Podle VanderVeena et al. (2003) je adukt M_1G schopný způsobit tzv. frameshift mutaci, což je situace, kdy dojde k deleci nebo naopak inserci nukleotidových párů, jejichž počet není dělitelný třemi. Tím může dojít ke vzniku terminačního kódu a následně k produkci zkráceného, potažmo nefunkčního polypeptidu. Niedernhofer et al. (2003) také zjistil, že MDA působí jako agent pro vznik tzv. interstrand cross-links. Tento pojem znamená, že dojde k vytvoření kovalentní vazby mezi dvěma nukleotidy, které jsou každý na

jiném vlákně DNA dvoušroubovice. Takto změněná struktura DNA může vézt až k buněčné smrti. Podobnou situaci, tj. vznik kovalentních vazeb mezi dvěma subjekty vlivem M_1G aduktu, popsali také Voitkun a Zhitkovich (1999). V tomto případě se však jedná o vazbu mezi proteiny a samotnou DNA. Tato dvojice popsala situaci, kdy došlo k vytvoření vazby mezi DNA a molekulou histonu pod fyziologickou hodnotou pH. Také tvrdí, že v případě reaguje-li molekula MDA nejdříve s DNA, zmíněná vazba nevznikne. Naopak když MDA reaguje nejdříve s molekulou proteinu, tak v tomto případě vznikne tzv. crosslink, jak již bylo popsáno výše. V případě že reaguje MDA s primárními aminy, může vzniknout mezi dvěma molekulami lyzinu také kovalentní vazba. Všechny uvedené skutečnosti mohou propuknout v mutace, které mohou představovat počátek rozvoje rakoviny (Del Rio et al. 2005).

V krvi představuje hlavní transportér lipidů lipoprotein o nízké hustotě (LDL), jehož zvýšené množství představuje riziko pro vznik ischemické srdeční choroby (CHD). Příčina tohoto procesu je modifikace proteinu (apolipoprotein B100), jež je součástí LDL, malondialdehydem. V důsledku toho dochází k zastavení interakce mezi LDL a receptory pro LDL, které jsou například v jaterních buňkách nebo krevních elementech – erytrocytech, leukocytech a trombocytech. V tomto případě může lipoprotein reagovat pouze s receptory, které jsou přítomny na makrofázích. Tato situace nastává, jakmile dosáhne modifikace postranních řetězců lyzinu více jak 15 % (Slatter et al. 2000).

Kolagenní vlákna jsou zpevněna pevnými vazbami, tzv. cross links, mezi molekulami lyzinu a aldehydu. Bylo zjištěno, že MDA dokáže reagovat s těmito vazbami a rozštěpit je, přičemž dochází ke kompetici s lyzinem o vazbu na aldehydu. MDA dokáže vytvořit tuto vazbu řádově rychleji než samotný lyzin (Slatter a kol., 2000). Takto postižená tkáň ztrácí flexibilitu a začíná tuhnout, což vede k problémům kardiovaskulárního aparátu (Del Rio et al. 2005).

Vlivem působení malondialdehydu může také dojít k narušení struktury fosfolipidové dvojvrstvy erytrocytů člověka (Uchida et al. 2000).

3.2.2 Metody detekce MDA

Zjišťování přítomnosti malondialdehydu je globálně nejvíce rozšířený způsob, jak identifikovat a zjistit rozah peroxidace lipidů, ať už během různých onemocněních či čistě pro laboratorní účely (Maboudou et al. 2002).

Momentálně existuje několik možných způsobů detekce tohoto aldehydu. Nejstarší a doposud i stále využívaná je metoda derivatizace s thiobarbiturovou kyselinou (TBA) (Chirico 1994; Templar et al. 1999; Agarwal & Chase 2002). Tato metoda byla dříve dominantně využívána z důvodu své relativní jednoduchosti a finanční nenáročnosti (Chirico 1994). Patří mezi spektroskopické metody, přičemž je založena na zahřívání vzorku v kyselém pH za formování aduktu MDA-$(TBA)_2$, který je následně detekován ve spektrofotometru při vlnové délce 532 nm (Chirico 1994; Templar et al. 1999; Del Rio et al. 2005) nebo je měřena fluorescence při 553 nm. Kalibrace tohoto testu je prováděna pomocí vzorku MDA, který byl připraven hydrolýzou 1,1,3,3-tetramethoxypropanu nebo 1,1,3,3-tetraethoxypropanu (Chirico 1994). Příprava vzorků pro tuto analýzu zahrnuje zahřátí až na

100 °C a takto vysoká teplota může způsobit další oxidaci, která ve výsledku způsobí nadhodnocení výsledků (Del Rio et al. 2005). Tento rozklad je katalyzován atomy železa v reagentu a může být inhibován chelátovými činidly. Během procesu rozkladu dochází k uvolňování radikálů, které mohou způsobit další peroxidaci lipidů, což vede opět k nadhodnocení výsledků. Reaktivita TBA je zvyšována vzrůstajícím množství lipidů ve zkoumaném vzorku, a naopak je snižována narůstajícím obsahem antioxidantů (Chirico 1994). Naneštěstí tato metoda má jednu značnou nevýhodu a tou je skutečnost, že TBA reaguje se spoustou dalších látek, jako jsou například jiné aldehydy – obecně se tyto látky reagující s thiobarbiturovou kyselinou označují TBARS („TBA reacting substances“), což ve výsledku opět způsobuje nadhodnocení výstupů. Proto má tato metoda charakter metody s nízkou specifitou a citlivostí (Templar et al. 1999; Agarwal & Chase 2002; Del Rio et al. 2003; Del Rio et al. 2005). Mezi další TBARS patří podle Czauderny et al. (2011) nukleové kyseliny, AMK, proteiny či fosfolipidy a podle Maboudou et al. (2002) dokonce i ribosa, biliverdin, pyrimidin nebo kyselina salicylová. Del Rio et al. (2005) tvrdí, že výsledné koncentrace zjištěné touto metodou mezi lety 1970–1995 se pohybovaly v rozmezí 0–50 μmol/l, což jasně naznačuje, že během procesu probíhala další oxidace. Na základě těchto všech faktů o relativní nepřesnosti TBARS metody, je tvrzeno, že výsledky vypovídají spíše o oxidovatelnosti vzorků, než jeho samotné oxidaci (Del Rio et al. 2005).

V organismu lze detekovat dva možné „typy“ MDA. Prvním je volný MDA, který není navázán na žádné biomolekuly či proteiny plazmy, a tudíž může být zjištěn i bez hydrolytické úpravy vzorku. MDA je rovněž navázán na matrix biomolekul a bez určité fyzikálně-chemické úpravy vzorku je nedetekovatelný. Využití různých organických rozpouštědel nebo silné kyseliny pro hydrolytický rozklad vazeb proteinových frakcí dovoluje střízlivější odhad obsahu celkového MDA, na který se zaměřuje právě metoda TBARS (Del Rio et al. 2005). Pro tuto úpravu vzorku se využívá kyselina fosforečná, trichloroctová nebo chloristá. Proces deproteinizace vede ke značnému zlepšení a zpřesnění celé metody (Templar et al. 1999).

Pro zlepšení specifity této metody se začala využívat vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Díky technice reverzní fáze dokáže tento přístroj oddělit komplex MDA-$(TBA)_2$ od dalších reagujících látek v biologických vzorcích. Výsledky pro tuto metodu se zpravidla pohybují mezi 1–2 μM, což je téměř pětinásobné nižší množství oproti výsledkům bez využití HPLC (Templar et al. 1999). Jako jeden z prvních využil HPLC při TBARS metodě Bird et al. (1983). Tento proces zahrnoval reakci s trichloroctovou kyselinou a následný supernatant zbavený proteinu byl zahříván na 100 °C po dobu 30 minut s 1% roztokem TBA. pH celého roztoku bylo doupraveno na hodnotu 1,5 pomocí 4M HCl a následně byl znovu centrifugován. Avšak proces nezahrnoval přidání žádného antioxidantu, aby se během zahřívání předešlo další oxidaci lipidů. Před vložením vzorku do kolony vyžaduje tato metoda neutralizaci vzorku, což nebylo možné, jelikož adukty je nutné disociovat při nízkém pH. Hodnota pH rovněž nesmí být nižší než 2, protože poté je inhibován vznik určité barvy, což vede ke zkreslení výsledků. Další nevýhodu využití HPLC spolu s TBARS popisují autoři Agarwal a Chase (2002), kteří tvrdí, že někdy je potřeba v koloně rozsáhlý regenerační postup či vyžadování čištění kolony mezi jednotlivými vstřikováními.

Existuje i metoda, která ve svém principu nevyužívá derivatizaci. V tomto procesu se úpravy vzorků před samotnou analýzou minimalizují pouze na kyselou hydrolýzu vazeb mezi

MDA a AMK a následné srážení proteinu. Plasma bez obsahu proteinu je poté rovnou vstříknuta do kolony v chromatografu a monitorována při 254 nm. Velkou výhodou je velmi malé potřebné množství vzorku – pouze 50 μl, přičemž minimální koncentrace požadovaná pro detekci je 0,012 μmol/l (Karatas et al. 2002).

V současnosti se za přesnější metody považují ty, jež využívají derivatizaci na jiné adukty, než je MDA-$(TBA)_2$. Pro samotnou detekci se poté využívá opět HPLC nebo plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) (Del Rio et al. 2005). Sim et al. (2003) využili reverzní fázi HPLC spolu s ultrafialovou detekcí a použitím methylmalondialdehydu (Me-MDA) jako standardu. Během této metody byla použita derivatizace s 2,4 - dinitrofenylhydrazinem (DNPH). Navzdory tomu, že samotná reakce probíhala v relativně mírných podmínkách, byly získané hodnoty celkem vysoké. Úprava vzorků plazmy před samotnou detekcí zahrnovala hydrolýzu po dobu 60 minut při 60 °C v 1M roztoku NaOH a následnou deproteinizaci ve 35% roztoku chloristé kyseliny. Rovněž tvrdili, že snížení naředění roztoku plazmy na 10 % zlepší hydrolýzu vázaného MDA. Podle Czauderny et al. (2011) je vhodnější využít derivatizačního agentu s vysokou molární absorptivitou při delší vlnové délce (<254 nm). V této studii bylo jasně prokázáno, že využití pracovního roztoku, který obsahoval 1 mg DNPH v 1 ml 4M HCl spolu s vyšší inkubační teplotou (50 °C), vedlo k identifikaci většího množství aduktů MDA-DNPH. Jako derivatizační agent byl použit i diaminonaftalen (DAN) (Steghense et al. (2001). V této metodě byla derivatizace prováděna za silně kyselých podmínek (pH 0,8) a pokojové teploty, přičemž následovala až po deproteinizaci, aby se zabránilo kyselé hydrolýze při reakci za velmi nízké hodnoty pH. Cighetti et al. (1999) použil jako derivatizační agent fenylhydrazin (PH) spolu s přístrojem pro detekci GC-MS. Reakce probíhala v tomto případě za mírných podmínek a jako standard byl využit 3-hydroxy[1,3-$^2H_2$]-2-propenal. Tato metoda vykazovala vysokou specifitu, citlivost i přesnost. Posledním možným použitým derivatizačním agentem je 2,4,6-trichlorfenylhydrazin (TCPH) a následná extrakce aduktů s hexanem (Stalikas & Konidari 2001).

3.3 Sója luštinatá (*Glycine max*)

Sója byla původně pěstována a využívána převážně díky svému poměrně vysokému obsahu tuku, který značně převyšuje obsah tuku u ostatních druhů luštěnin. Nejvíce se začátkem 20. století pěstovala v USA (Britzman 2001). Celosvětově patří k největším a nejcennějším zdrojům rostlinného proteinu. Její pěstování je lokalizováno převážně na území Jižní a Severní Ameriky, kde prvenství drží USA (Nahashon & Kilonzo-Nthenge 2011). Kromě vysokého obsahu tuku také sója vyčnívá relativně vysokým obsahem bílkovin, které mají vysokou biologickou hodnotu (Šťastník et al. 2016). Podle Krejcara (2011) je další nespornou výhodou to, že sóju lze pěstovat na témže místě několik let po sobě, a to bez jakýchkoliv negativních dopadů. Za jednu z hlavních nevýhod zkrmování sóji lze považovat relativně vysoký obsah antinutričních látek, které lze však celkem snadno eliminovat tepelnou úpravou (Zelenka 2014).

Mezi nejdůležitější antinutriční látky v sóji patří inhibitory proteolytických enzymů, konkrétně inhibitory trypsinu a chymotrypsinu. Existují dva druhy inhibitorů – Kunitzova a

Bowman-Birkova typu (Winiarska-Mieczan 2007). Tzv. Kunitz inhibitor se zaměřuje především na enzym trypsin. Jeho molekula má vyšší molekulovou hmotnost, je složená z 181 AMK a velmi pevně se váže na aktivní místo enzymu. Bowman-Birke inhibitor má naopak nižší molekulovou hmotnost a je známo 5 druhů, které se v sóje vyskytují (Slugeň 1997). Důsledkem konzumace tepelně neupravené sóji je snížená retence dusíku (N) v těle a zároveň jeho zvýšené vylučování z organismu. Takto postižená zvířata pomaleji rostou (Banaszkiewicz 2011) a také dochází ke zvětšení slinivky břišní, jelikož organismus se snaží o podporu trávení bílkovin zvýšenou aktivitou pankreatu a tím i sekreci většího množství enzymu (Zelenka 2014; Šťastník et al. 2016). Uvádí se, že kur domácí je na tyto inhibitory citlivější než ostatní druhy zvířat, nicméně správnou tepelnou úpravou lze eliminovat minimálně 90 % aktivity antitrypsinu (Banaszkiewicz, 2011). Nahashon a Kilonzo-Nthenge (2011) uvádějí, že obsah těchto inhibitorů lze také snížit genetickou modifikací nebo šlechtěním.

Lektiny(hemaglutininy) jsou glykoproteiny, které jsou schopné se vázat na sacharidy. Jedním z negativních důsledků této vlastnosti je vazba na povrchy různých buněk, na kterých jsou sacharidy přítomny. Následně může dojít ke shlukování buněk (např. červených krvinek). Negativně je poté ovlivněno zejména trávení proteinů (Šťastník et al. 2016). V sóji se zpravidla vyskytují v množství 0,2–3,1 g/kg sušiny (Fasina et al. 2003).

Kyselina fytová představuje v semenech nejen sóji, ale i dalších druhů rostlin, zásobárnu minerálních látek, především fosforu (P), ale i vápníku (Ca), hořčíku (Mg), draslíku (K), železa (Fe) nebo zinku (Zn) (Nahashon & Kilonzo-Nthenge 2011). Kyselina fytová rovněž zeslabuje účinky enzymů jako je pepsin, trypsin nebo amyláza, stejně tak negativně ovlivňuje dostupnost bílkovin, potažmo i AMK, ale i škrobu a energie (Ravindran et al. 2000). Banaszkiewicz (2011) tvrdí, že v sóje jsou takto uloženy dvě třetiny fosforu a obsah kyseliny fytové představuje zhruba 1–1,5g/kg sušiny. U monogastrů se celkem běžně přidává do krmných směsí enzym fytáza, který snadno uvolní P z komplexu kyseliny fytové a tím se sníží množství vylučování nevyužitého P do prostředí (Nahashon & Kilonzo-Nthenge 2011).

Mykotoxiny představují celosvětový problém, který se netýká jen sóji, ale i drtivé většiny rostlinných produktů. V semenech sóji se nejčastěji vyskytuje ochratoxin, jakožto produkt hub Penicilium varrucosum a Aspergillus ochraceous, a zearalenon z hub rodu Fusarium graminearum. Při vyšších dávkách mohou způsobovat estrogenní efekt a tím i reprodukční problémy (Banaszkiewicz 2011).

Pro skupinu luštěnin je typickou vlastností přítomnost flatulentních oligosacharidů, které při vyšších dávkách způsobují problémy s trávením jednotlivých živin a zvětšení střev (Salgado et al. 2002). Podle Rubia et al. (1998) dochází také k ovlivňování množství střevní mikrobioty a při podávání syrových neupravených bobů hrozí u kuřat zpomalení rychlosti růstu.

3.3.1 Plnotučná sója

Semeno sóji se skládá ze slupky a z endospermu. Slupka tvoří kolem 8 % a obsahuje převážně vlákninu, zatímco endosperm představuje zbytek obsahující především bílkoviny,

tuk, sacharidy, ale i antinutriční látky. Sója díky své tenké slupce obsahuje cca 6 % vlákniny, což je oproti ostatním rostlinným zdrojům bílkovin relativně málo (Banaszkiewicz 2011).

Jak již bylo řečeno v předešlé kapitole, sója obsahuje značné množství hrubého proteinu. Běžně se uvádí zpravidla 36 % (Zelenka 2014) až 38 % (Nahashon & Kilonzo-Nthenge 2011) a Banaszkiewicz (2011) uvádí dokonce až 43,6 %. Samozřejmě na obsah jednotlivých nutrientů mají vliv faktory jako odrůda, stupeň zralosti, podmínky a doba skladování, podnebí apod. (Slugeň 1997; Karr-Lilienthal et al. 2006; Nahashon & Kilonzo-Nthenge 2011). Například Grieshop a Fahey (2001) tvrdí, že sójové boby pocházející z Číny obsahují vyšší množství hrubého proteinu, a naopak nižší množství tuku oproti sóje vypěstované v Brazílii nebo USA. Aminokyselinové složení sójového proteinu je velmi kvalitní, některé zdroje ho dokonce srovnávají s proteiny živočišného původu. Je zde přítomno velké množství lyzinu, tryptofanu, threoninu, izoleucinu a valinu, naopak se zde vyskytuje deficit sirných AMK – methioninu a cysteinu. Sója je obecně charakterizována nejvyšší stravitelností proteinu, lyzinu i deficitního methioninu (Nahashon & Kilonzo-Nthenge 2011).

Obsah tuku může kolísat v závislosti na proměnlivých faktorech mezi 15,5–24,7 % sušiny. Drtivá většina (99 %) lipidové frakce v sójovém oleji je tvořena triglyceridy, přičemž je zde vysoké množství PUFA (kyselina linolová a linoleová) a mononenasycených MK, jako je například kyselina olejová (viz Tabulka 1) (Vavrečka et al. 2005; Banaszkiewicz 2011).

Tabulka 1: Složení mastných kyselin a jejich procentuální zastoupení v semenu a v oleji (ENV/JM/MONO15 2001)

MK	**OBSAH V SEMENU (%/DM)**	**OBSAH V OLEJI (%)**
Palmitová	1,44–2,31	7–12
Stearová	0,54–0,91	2–5
Olejová	3,15–8,82	19–34
Linolová	6,48–11,6	48–60
Linolenová	0,72–2,16	2–10
Arachidonová	0,04–0,7	<1,0

Množství minerálních látek je ovlivněno jednak původem, způsobem a technologickým provedením zpracování sóji. Sója obsahuje rovněž vysoký obsah fosforu (Banaszkiewicz 2011).

Kromě vysokého obsahu bílkovin je sušina z velké části tvořena také sacharidy, které představují zhruba třetinu sušiny. Nicméně škrobu je zde pouze v rozmezí 4,66–7 %, naopak se v sóje vyskytuje větší množství pektinů a hemicelulózy (Ensminger 1990).

Metabolizovatelná energie plnotučné sóji pro drůbež je rovněž vysoká – 15 MJ/kg sušiny (Jiang 2003).

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3 Sója luštinatá (Glycine max), tepelně neupravená sója obsahuje velké množství antinutričních látek, které by při podávání zvířatům měly negativní dopad na jejich zdraví a produkci. Proto je nezbytné sóju tepelně zpracovat. Díky zvýšené teplotě dochází jednak ke snížení aktivity antinutričních látek, eliminaci nežádoucích

mikroorganismů, ale i ke zlepšení dostupnosti jednotlivých nutrientů (Zeman et al. 2005). Během zahřátí okolo 100 °C dojde k narušení struktury bílkovin a tím k zastavení aktivity trypsinových inhibitorů, a naopak ke zvýšené dostupnosti AMK lyzinu, methioninu a threoninu (viz Tabulka 2) (Britzman 2001). Pokud se teplota zvýší příliš , dojde k opačnému a nežádoucímu procesu (Banaszkiewicz 2011). Aminokyselina lyzin je specifická tím, že při nadměrném zahřátí dochází k vazbě aminoskupiny na karbonylové skupiny sacharidů – tzv. Maillardova reakce, přičemž výsledkem je snížená dostupnost aminokyselin i sacharidů (Britzman 2001). Negativní vliv příliš vysoké teploty na stravitelnosti AMK lyzinu a cysteinu je patrný z Tabulky 3.

Tabulka 2: Efekt různé délky expozice syrových sójových semen v autoklávu na stravitelnost vybraných AMK (%) (Britzman 2001)

DOBA AUTOKLÁVU (MIN)	**LYZIN**	**METHIONIN**	**THREONIN**
0	73	65	64
9	78	70	68
18	87	86	82

Tabulka 3: Efekt vystavení SEŠ po různou dobu v autoklávu při 121 °C na stravitelnost a koncentraci AMK (%). Negativní vliv vyšší teploty a delší doby expozice na stravitelnost a koncentraci je patrný u lyzinu a cysteinu, naopak u methioninu a threoninu nedošlo k významným změnám (Britzman 2001)

DOBA AUTOKLÁVU PŘI 121 °C (MIN)	**LYZIN**	**CYSTEIN**	**METHIONIN**	**THREONIN**
Stravitelnost (%)				
0	91	82	86	84
20	78	69	86	86
40	69	62	83	84
Koncentrace (%)				
0	3,27	0,70	0,71	1,89
20	2,95	0,66	0,71	1,92
40	2,76	0,63	0,71	1,87

Mezi faktory mající vliv na konečný produkt tepelného zpracování patří teplota, délka expozice, vlhkost, tlak ale i průběh změny teploty (Mervart 2005). Liener (2000) také uvádí, že na látky jako jsou saponiny, estrogeny, fytáty nebo sacharidy nemá zvýšená teplota prakticky žádný vliv. Tepelné zpracování má pozitivní efekt i na tukovou frakci. U enzymů jako je lipáza a lipooxidázy dochází k denaturaci, zvyšuje se oxidační stabilita tuků a dochází

ke zpomalení rozkladu. Vitamíny patří mezi termolabilní složky, tudíž dochází k jejich částečné likvidaci (Zeman et al. 2005). Mervart (2005) uvádí, že nejefektivnějším zpracováním sójových bobů je extruze. Během extruze dochází k inhibici trypsinových blokátorů, destrukci především vitamínů A, C, niacinu (B_3) a thiaminu (B_1) a přeměny bílkovinné frakce B1 na B2 a B2 na B3.

3.3.2 Sójové výlisky

Metoda mechanického lisování olejnatých semen je mnohem starší oproti extrakci rozpouštědlem. Tento proces zahrnuje prvotní narušení struktury semene sóji, následuje lehké vysušení a následně zahřátí horkou vodní párou. Takto upravená semena putují do mechanického lisu (nejčastěji šnekového) a tlakem se odstraní olej. Sójové výlisky jsou poté nasušeny a rozdrceny. Zbytkový produkt, který zbyde po lisování, není třeba tepelně ošetřovat kvůli inaktivaci antinutričních látek, jelikož během lisování se materiál sám dostatečně zahřívá (Johnson & Smith 2004). Efektivnost tohoto procesu zpravidla nepřesáhne 70 % (Grieshop et al. 2003). Toto proteinové krmivo obsahuje nižší obsah dusíkatých látek, ale naopak vyšší obsah tuku, což ho činí chutnějším (Johnson & Smith 2004).

3.3.3 Sójový extrahovaný šrot

Sójový extrahovaný šrot (SEŠ) vzniká jako vedlejší produkt při extrakci tuku ze sójových semen (Cromwell 2012). V současnosti reprezentuje téměř dvě třetiny všech proteinových krmiv (Oil World 2015) a na světě není žádný rostlinný zdroj proteinu, který by dokázal SEŠ ve svých kvalitách předčit. Dokonce je používán jako standart při srovnávání různých zdrojů proteinů (Cromwell 1999). Sójový extrahovaný šrot představuje základní komponent kompletních krmných směsí pro drůbež (Brzóska et al. 2009)

SEŠ obsahuje vysoké množství dusíkatých látek. Většina zdrojů uvádí, že se hrubý protein pohybuje v rozmezí 44–48 (49) % (Britzman 2001; Van Eys et al. 2004; Nahashon & Kilonzo-Nthenge 2011; Cromwell 2012; Zelenka 2014). Bandegan et al. (2010) tvrdí, že oproti ostatním olejnatým semenům je SEŠ nejvíce stravitelný, přičemž stravitelnost AMK jako je cystein nebo fenylalanin se pohybuje v rozmezí 83–93 %. Nahashon a Kilonzo-Nthenge (2011) také potvrzují, že SEŠ obsahuje vyšší množství energie oproti ostatním šrotům z olejnatým semenům spolu s nízkým obsahem vlákniny. Podle množství dusíkatých látek se daný šrot označuje číslem – Soybean meal 46, 48 apod. V tomto čísle je ještě započítán zbytkový tuk, jehož množství se pohybuje mezi 1,5–1,9 % (Johnson & Smith 2004; Zelenka 2014), naopak Britzman (2001) uvádějí hodnotu <1 %. Sójový extrahovaný šrot má velmi vysoké hodnoty pro stravitelnost limitujících aminokyselin – lyzin 92 %, methionin 92 % a cystein 82 % (Britzman 2001). Pettigrew et al. (2008) tvrdí, že díky vysoké stravitelnosti AMK a obsahu limitujících aminokyselin v SEŠ, se do diet, kde je obsažen, může zařazovat celkově nižší množství proteinových krmiv, což snižuje vylučování nevyužitého dusíku do prostředí.

Energetická hodnota vedlejších produktů zpracování sóji závisí na použité technologii, která poté ovlivňuje chemické složení, stravitelnost a dostupnost jednotlivých složek (Banaszkiewicz 2011). Nicméně podle Parsonsa et al. (2000) je metabolizovatelná energie (ME) pro drůbež relativně malá při srovnání s její velkou brutto energií (BE). Na vině je

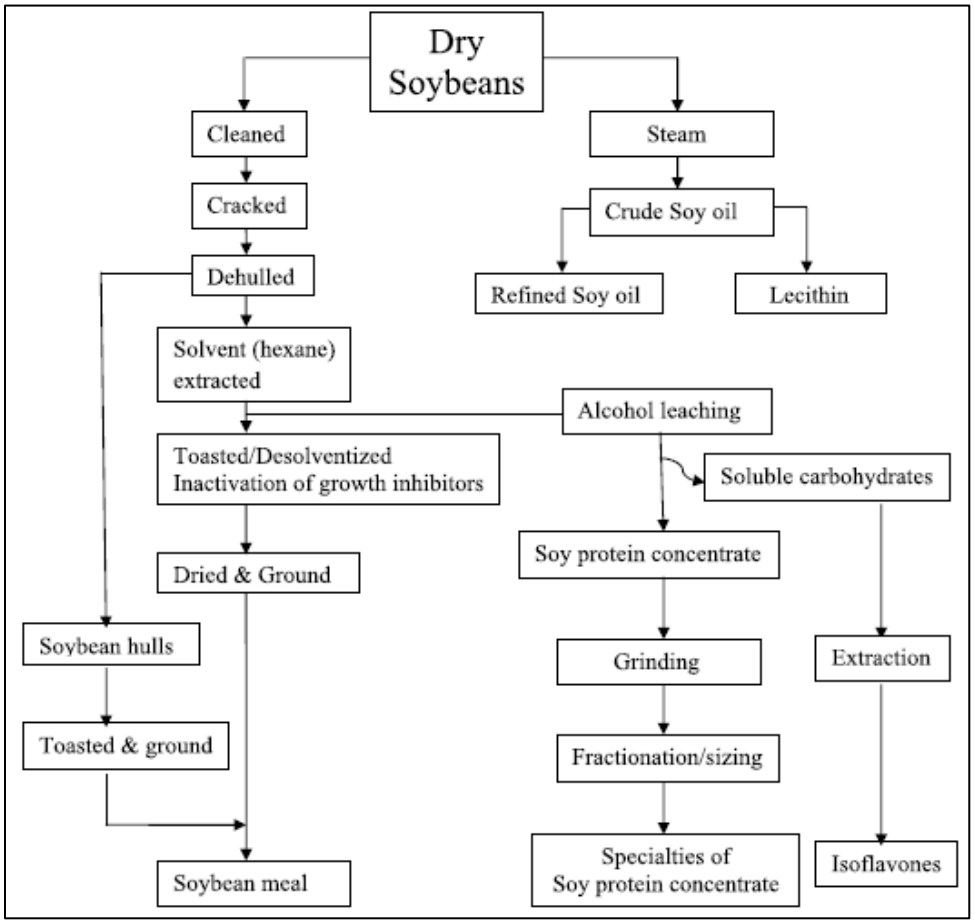
pravděpodobně velmi nízká stravitelnost polysacharidové frakce, která je tvořena mj. rafinózou a stachyózou. V malém žaludku kura je totiž absence enzymu α-(1,6)-galaktosidázy, který je schopen tyto oligosacharidy rozštěpit. Samozřejmě nejen proces zpracování ovlivňuje kvalitu SEŠ, nýbrž i původní surovina. Tzv. že na kvalitu šrotu mají vliv i faktory, které ovlivňují kvalitu vypěstovaných semen (Britzman 2001; Grieshop et al. 2003).

Banaszkiewicz (2011) tvrdí, že vedlejší produkty sóji trpí náchylností k oxygenaci, a to z důvodu přítomnosti nenasycených mastných kyselin, zejména linolové. Během tohoto procesu dochází ke zvýšení množství kyseliny palmitové, stearové a olejové na úkor kyseliny linolové a linoleové.

Obsah vlákniny je závislý na skutečnosti, zdali se prvotně odstraněné slupky do šrotu ke konci opět přimíchají a v jakém konkrétním množství. Šrot s obsahem slupek obsahuje maximálně 7 % vlákniny, naopak šrot bez slupek pouze 3,3–3,5 % (Dawin & Britzman 2001).

Stejně tak i SEŠ obsahuje značné množství minerálních látek, přičemž nejvyšší je obsah fosforu. Bohužel mezi množstvím vápníku a fosforu není ideální poměr (0,5:1) (Vavrečka et al. 2005).

Podle Van eys et al. (2004) a Grieshopa et al. (2003) je metoda extrakce za pomocí rozpouštědla („solvent extraction“) globálně nejrozšířenější metodou izolace sójového oleje.



Obrázek 5: Schématické znázornění zpracování sójových semen na sójové produkty. V tomto případě sójový extrahovaný šrot a sójový proteinový koncentrát (Nahashon & Kilonzo-Nthenge 2011)

Efektivnost tohoto procesu je kolem 99 %. Na počátku tohoto procesu dojde k rozbití a odstranění slupky, následně k zahřátí a samotné extrakci pomocí rozpouštědla hexanu (nejčastěji). Před samotnou extrakcí mohou být sójové semena zpracovány v expandéru, který poté snižuje potřebné množství použitého rozpouštědla. Po odstranění většiny oleje jsou semena vysušena, tím se odstraní zbytky rozpouštědla a poté dojde k toastování (vystavení vysoké teploty po dobu 1–10 minut) a namletí. Krátkodobé zahřátí eliminuje antinutriční látky a zvyšuje stravitelnost samotného produktu. Na konci procesu se do šrotu mohou přidat odstraněné slupky, které byly rovněž tepelně ošetřeny (Johnson & Smith 2004; Van Eys et al. 2004; Nahashon & Kilonzo-Nthenge 2011). O´Quinn et al. (1997) poukazuje na nutnost stoprocentního odstranění veškerého možného obsahu hexanu v koncovém produktu, jelikož hexan je extrémně hořlavý, nebiodegradovatelný, může způsobit zdravotní potíže a působí i jako vzdušný polutant. Proces výroby SEŠ a sójového proteinového koncentrátu se všemi jeho kroky je znázorněn na Obrázku 5.

3.4 Trávicí soustava kura domácího

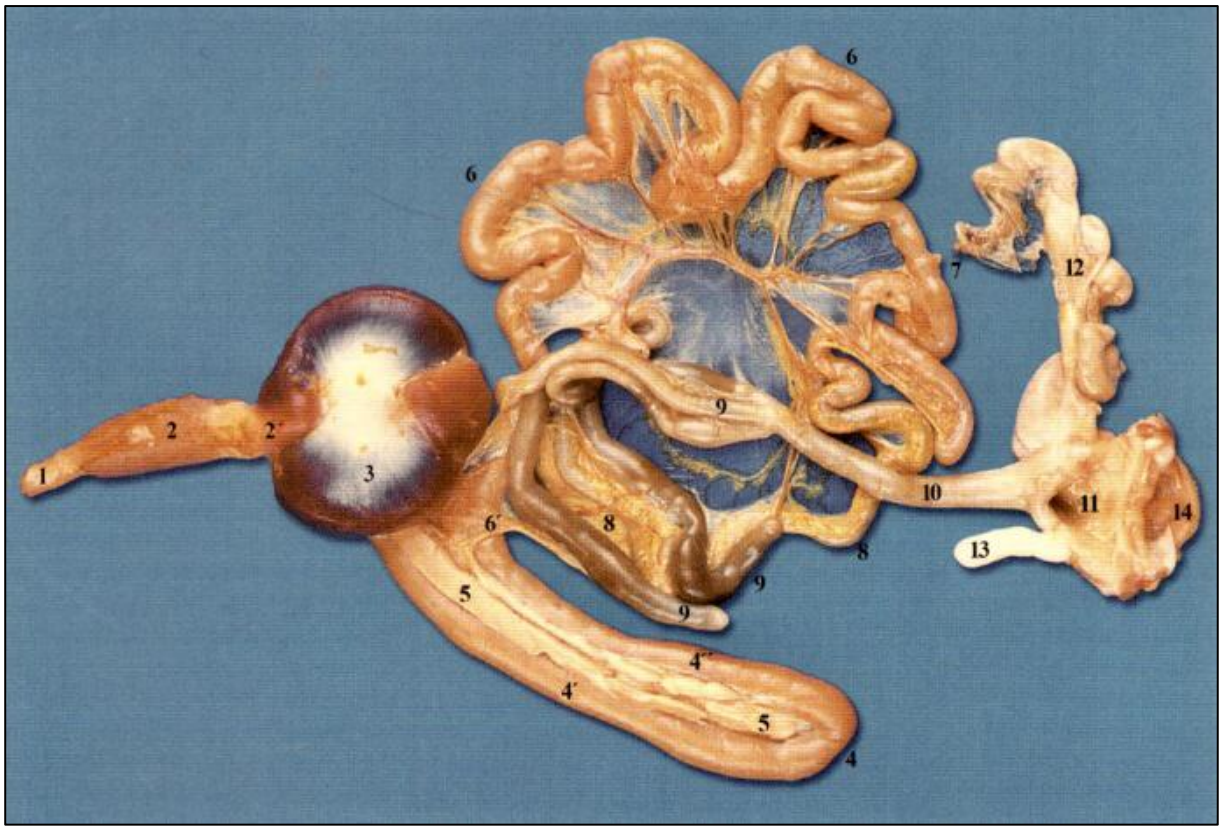
Trávicí soustava ptáků je v několika směrech značně specifická. Mezi morfologické, ale i funkční odlišnosti například oproti savcům patří bezesporu přítomnost zobáku, jakožto počátek trávicí soustavy. Uvnitř ústní dutiny nejsou přítomny žádné zuby. Dále pokračuje trávicí trubice voletem, který navazuje na žaludek rozdělený na dvě části – svalnatý a žlaznatý. U ptáků figurují dvě slepá střeva a soustava je zakončena kloakou (Kodeš & Výmola 2003). Dalším aspektem, který činí trávicí soustavu ptáků odlišnou je její délka. Vzhledem k délce těla je délka střev pouze 5x delší, což z ní dělá velmi krátkou trávicí soustavu. Například u prasat je tento poměr 15:1 a u přežvýkavců dokonce 20:1. Vzhledem k této relativně krátké délce je jasné, že intenzita přeměny živin je vysoká (Kříž 1997). Zastoupení mikroorganismů, které napomáhají trávení je u ptáků rovněž nízké, stejně tak doba mikrobiálního trávení (Parkhurst & Mountney 1988). Celá trávicí soustava kura domácího je vidět na Obrázku 6.

Dutina ústní u ptáků se vyznačuje nízkým počtem chuťových pohárků, které vnímají především kyselou chuť, avšak málo slanou. Výběr krmiva probíhá především na základě mechanoreceptorů, které jsou přítomny na špičce horního i dolního zobáku, a také na základě optických vjemů. Čich není u drůbeže vůbec vyvinut (Zelenka 2014). Vzhledem k tomu, že drůbež preferuje větší částečky krmiva, je dle Kříže (1997) vhodné, krmit zejména granulovanými krmivy. Také uvádí, že preferují spíše hrubší a tvrdší krmiva.

V dutině ústní je přítomný jazyk, který slouží nejen jako smyslový orgán, ale také napomáhá posunu tráveniny dále do trávicí trubice (Kříž 1997). Kodeš a Výmola (2003) uvádějí, že systém slinných žláz je zcela vyvinut. Sliny hrabavé drůbeže obsahují amylázu a jejich pH se pohybuje okolo hodnoty 6,78. Denní produkce slin je v rozmezí 7–25 ml.

Jícen je charakteristický značnou roztažitelností i pohyblivostí. Přítomna je zde silná sliznice s dláždicovým epitelem, pod kterou je řídké vazivo protkané pružnými vlákny. Velmi charakteristickou částí trávicí soustavy nejen hrabavé drůbeže je vole. Vole je vak, který vzniknul zřasením a vychlípením sliznice jícnu. Jeho objem činí zhruba 75–100 g krmiva. Potrava zde nepodléhá žádnému trávení, ale jen zde dochází k bobtnání, což usnadňuje další

mechanické i chemické zpracování (Kodeš & Výmola 2003). Ve žláznatém žaludku dochází k vylučování žaludeční šťávy, což je podpořeno přítomností bílkovin v přijaté potravě (Kříž 1997). Žaludeční šťáva obsahuje mucin, kyselinu chlorovodíkovou (HCl) a pepsinogen, který se právě přítomností HCl mění na aktivní pepsin, jež rozkládá proteiny na peptidy a aminokyseliny. Hodnota pH žaludeční šťávy je mezi 1,5–2 (Zelenka 2014) až 2,5 (Parkhurst & Mountney 1988). Druhá část žaludku – svalnatý žaludek, je tvořen dvěma páry hladkých svalů, dvěma svaly vmezeřenými a hlavními svaly postranními. Hlavními funkcemi je vytváření třecích pohybů, které mají za úkol mechanicky rozmělňovat již částečně zpracovanou potravu. U kura domácího dojde za minutu ke čtyřem kontrakcím, přičemž každá trvá okolo 15 sekund. K mechanickému zpracování potravy dochází také vlivem silné ploténky, jež je přítomna v dutině žaludku a chrání ho před poškozením od gritu (Kodeš & Výmola 2003). Ve svalnatém žaludku dochází k částečnému trávení lipidů, sacharidů, ale i proteinů, jelikož díky antiperistaltickým pohybům, se zde z tenkého střeva dostává pankreatická šťáva a žluč. Hrabavá drůbež běžně polyká menší kamínky – grit, který slouží k dalšímu rozmělnění potravy. Grit sám o sobě není nezbytný pro rozdrcení krmiva, nicméně



Obrázek 6: Trávicí a část rozmnožovací soustavy kura domácího: 1 - jícen, 2 - žlaznatý žaludek, 2´ - přechodný úsek žaludku,3 - svalnatý žaludek, 4 - dvanáctníková klička (duodenum), 4´ - SEŠtupná sloha dvanáctníku, 4" - vzestupná sloha dvanáctníku, 5 - pankreas, 6 – lačník (jejunum), 6´ - přechod do lačníku, 7 – divertikulum vitellinum, 8 – kyčelník (ileum), 9 – slepá střeva (ceca), 10 – přímé střevo (rektum), 11 – kloaka (koprodeum), 12 – levý vejcovod, 13 – pravý vejcovod, 14 – proktodeum a zevní vyústění kloaky (Černý 2005)

podává se buď ve formě nerozpustného gritu (např. drcená žula) nebo tzv. vápenatý grit (=drcený vápenec), který slouží i jako zdroj vápníku (Ca) (Zelenka 2014). Stěny svalnatého žaludku jsou před nízkým pH chráněny tlustou vrstvou epitelu (Parkhurts & Mountney 1988).

Uprostřed dvanáctníkové smyčky (č. 4 na Obrázku 6) je uložen pankreas (slinivka břišní), která tvoří a vylučuje enzymy hydrolyzující proteiny, sacharidy i tuky. Stejně tak vylučuje inzulin, který reguluje metabolismus sacharidů (Parkhurts & Mountney 1988).

Po svalnatém žaludku odchází tráveniny do první části tenkého střeva – duodena (dvanáctník). Ve střevech probíhá nejintenzivnější chemické trávení, a to díky žluči a pankreatické šťávě (Kodeš & Výmola 2003). Vývody slinivky břišní ústí u drůbeže ústí až do distální části duodena. Šťáva zde obsažená obsahuje trypsinogen, lipázu, amylázu, karboxypeptidázy, cholesterolesterázy, chymotrypsinogen a hydrogenuhličitan sodný. Hodnota pH zde nikdy nepřekročí 7 (Zelenka 2014).

U ptáků se tlusté střevo skládá ze dvou střev slepých a konečníku (rectum) (Kodeš & Výmola 2003). Povrch tlustého střeva u ptáků je oproti savcům zvětšen klky, které se normálně vyskytují jen v tenkém střevě. Slepá střeva jsou místem syntézy některých vitamínů a produkce kyseliny máselné, octové a propionové vlivem působení mikrobioty. Oproti ostatním částem trávicího traktu zde vydrží trávenina poměrně dlouhou dobu, a to až 24–48 hodin (Zelenka 2014). Kodeš a Výmola (2003) tvrdí, že ve slepých střevech dochází mimo jiné k intenzivnějšímu trávení vlákniny a absorpci produktů vzniklých na základě působení mikroorganismů.

Konečnou částí trávicí soustavy u ptáků je kloaka, která je zároveň vývodem i pro rozmnožovací a vylučovací soustavu. Rektum pozvolna přechází v část zvanou koprodeum, jež funguje jako shromaždiště výkalů. Vejcovod, močovod a chámovody ústí do částí, která nese název urodeum. Úplně konečnou částí kloaky je proktodeum (Zelenka 2014).

3.5 Snáška a snáškový cyklus nosnic

Ze všeho nejdříve je nutno porozumět minimálně základní terminologii, která se týká vývinu organismu nosnic a následné snášky. V okamžiku, kdy organismus zvířete zahájí tvorbu pohlavních buněk, nastává období pohlavní dospělosti. V době těsně před dokončením vývinu a růstu je již možné zvíře využít pro plemenitbu. V tuto chvíli říkáme, že zvíře dosáhlo chovatelské dospělosti. Posledním obdobím je dosažení tělesné dospělosti, tj. když organismus zvířete ukončí růst a vývin (Prombergerová 2005a). Nosností rozumíme schopnost nosnice nést za určitou dobu dané množství vajec, přičemž tato vlastnost je dědičná. Pod pojmem snáška rozumíme skutečné množství vajec, které byly sneseny jednou nosnicí za určitý časový interval (Arent et al. 1998). Na tento údaj se podílí jak vlivy související s nosnicí, tak i vlivy vnější. Posledním pojmem je intenzita snášky, což je počet snesených vajec, kde hraje roli délka série (dny jdoucí po sobě, kdy nosnice snesla vejce) a délka intervalu (dny, kdy slepice nesnesla vejce) mezi danými sériemi (Prombergerová 2005b; Johnston a Gous, 2006). Počet dnů v sérii a intervalu je dán geneticky (Arent et al. 1998).

Mezi vnitřní faktory, které mají vliv na snášku patří určitě genotyp nosnice, věk, pohlavní dospělost (Arent et al. 1998), dále zdravotní stav celého hejna, hmotnost

(Prombergerová 2011b), ale samozřejmě i kondice nosnice (Prombergerová 2005b). Mezi vnější faktory bychom mohli zařadit teplotu prostředí, přičemž za ideální se považuje rozmezí 20–23 °C, a světlo – resp. délka světelného dne. Jedním z nejdůležitějších vlivů je rozhodně výživa nosnic (Arent et al. 1998). Mimo jiné na snášku má negativní vliv i kvokání, během kterého nosnice vejce nenosí. Vliv na snášku má i vlhkost vzduchu, která by se měla podle Prombergerové (2011b) pohybovat mezi 50–70 %.

Samotný počátek snášky není dán jen genotypem nosnice nýbrž jde ovlivnit vnějšími faktory. Stejně tak dokáže začátek snášky ovlivnit celý snáškový cyklus (Prombergerová 2011a). Pokud chovatel příliš uspěchá začátek snášky, například navýšením obsahu bílkovin v krmné směsi, organismus nosnice se zbytečně stresuje ještě ve chvíli, kdy není pořádně vyvinut. Výsledkem mohou být brzké zdravotní komplikace a snášení malých vajec. Začátek snášky byl měl být po 5. měsíci u lehkých plemen, po 6. měsíci u středně těžkých plemen a až po 8. měsíci u těžkých plemen (Prombergerová 2011b). Nejčastěji se pro produkci konzumních vajec využívají středně těžká a lehká plemena, která mají výhodu nižší hmotnosti a tím i menší nároky na množství krmiva (Prombergerová 2011a).

Snesením prvního vejce se odstartuje snáškový cyklus, který zpravidla končí pelicháním, během kterého nosnice vejce nenesou (Prombergerová 2011a). První snesená vejce bývají malá, nazývají se kuřecí a mohou být znečištěna krví (Prombergerová 2011b). V období dosahování pohlavní dospělosti mohou být v hejnu výrazné věkové rozdíly a to až 10 týdnů. Cyklus je rozdělen do třech fází. První fáze trvá obvykle 20–24 týdnů (40.–44. týden věku), přičemž ve věku 26–32 týdnů dosahují samice vrcholu snášky a s tím jsou také spojeny vyšší nároky na jednotlivé živiny. Kromě snášky narůstá také hmotnost jednotlivých vajec, peří i hmotnost samotných slepic (Arent et al. 1998; Prombergerová 2011). V této fázi se krmí krmnou směsí o obsahu 11,5 MJ metabolizovatelné energie a 17 % dusíkatých látek (Zelenka 2014).

Druhá fáze trvá obdobně jako ta první okolo 20 týdnů. V tomto období dochází k mírnému poklesu snášky a zároveň je ukončen růst těla slepic, nicméně je zvýšená intenzita ukládání tuku, tudíž živá váha se může i nadále zvyšovat (Arent et al. 1998; Prombergerová, 2011a). Množství metabolizovatelné energie zůstává stejné, ale dochází k mírnému poklesu obsahu dusíkatých látek – cca o 1 % (Zelenka 2014).

V poslední fázi i nadále klesá intenzita snášky. Dále dochází ke zkracování dnů, během kterých slepice snesla vejce (série) a tím i k prodlužování počtu dnů, kdy nosnice vejce nenesou (interval). Může ještě docházet k mírnému zvyšování hmotnosti vajec a ukládání tuku. Zvláště ke konci této fáze dochází ke snižování pevnosti skořápky, a pak následuje pelichání (Arent et al. 1998; Prombergerová 2011a).

V období pelichání mají slepice vyšší nároky na dusíkaté látky, proto se podává směs pro nosnice. Pro nárůst metabolizovatelné energie se může do krmných směsí přidat i větší množství olejnatých semen (Prombergerová 2005b).

Celý snáškový cyklus může trvat až 64 týdnů v závislosti na věku nosnice. Během prvního roku snesou nosnice nejvyšší počet vajec, ale jejich velikost je nižší zhruba o 8 % v porovnání s dalšími roky (Prombergerová 2011a).

3.6 Nutriční požadavky nosnic

3.6.1 Energie

Pro drůbež se energetická potřeba vyjadřuje v rámci jednotek bilančně metabolizovatelné energie upravené na dusíkatou rovnováhu (ME_N) nejčastěji v jednotkách kJ nebo MJ. Pro zjištění těchto hodnot je potřeba od metabolizovatelné energie odečíst spalné teplo trusu a tím se získá klasická metabolizovatelná energie. Pro její výpočet se využívá vzorec:

$$\mathbf{ME_N = \frac{M_{krm} \cdot E_{krm} - M_{ex} \cdot E_{ex}}{M_{krm}}}$$

kde M je hmotnost sušiny v kilogramech, E je spalné teplo v MJ v 1 kg sušiny a index „krm“ značí krmivo a index „ex“ exkrementy. Jelikož během bilančních pokusů na zjištění ME_N dochází k tomu, že si drůbež v těle uloží část energie ve formě bílkovin, nachází se tím v pozitivní dusíkaté bilanci. Abychom zjistili, kolik metabolizovatelné energie by zvíře získalo, kdyby veškeré dusíkaté živiny využilo jen na tvorbu energie, musíme snížit klasickou metabolizovatelnou energie o 36,55 kJ za gram dusíku uloženého v těle. Při použití klasické metody se poté ME_N spočte podle vzorce:

$$\mathbf{ME_N = ME - 0{,}03655 \left(\frac{M_{krm} \cdot N_{krm} - M_{ex} \cdot N_{ex}}{M_{krm}} \right)}$$

kde N značí množství dusíku vyjádřeného v gramech na kilogram sušiny. Dalším způsobem je výpočet ME_N podle obsahu živin v krmivu (Zelenka, 2014). V tomto případě se využívá vzorec:

ME_N = 34,31 . tuk (g/g) + 15,51 . dusíkaté látky (g/g) + 16,69 . škrob(g/g) + 13,01 . cukr(g/g)

Při denní spotřebě krmiva 115 g denně se uvádí potřeba ME_N 11,5 MJ v 1 kg krmné směsi (Zelenka a kol., 2007).

3.6.2 Tuk

Tuk je bezesporu energeticky nejvíce výhodnou živinou a zároveň zvyšuje chutnost krmiv. Hodnota jeho metabolizovatelné energie je 36 MJ/kg. Molekula tuku se skládá z glycerolu a mastných kyselin, které se ještě dělí podle charakteru vazeb mezi jednotlivými lokanty. Ve výživě zvířat se sleduje především obsah některých polynenasycených mastných kyselin, které jsou pro organismus esenciální a hrají roli v celé řadě procesů. Nejdůležitějšími jsou kyselina linolová (n-6) a kyselina α-linolenová (n-3), ze kterých jsou dále tvořeny další esenciální mastné kyseliny. Označení n-6 a n-3 značí polohu poslední dvojné vazby na

uhlíkatém řetězci. Metabolity jako je kyselina arachidonová (odvozená od kyseliny linolové) a kyselina eikosapentaenová a kyselina dokosahexaenová (odvozené od kyselina α-linolenové) mají například vliv na propustnost buněčných membrán či jsou metabolizovány na eikosanoidy, které hrají roli v reprodukci, vývoji nebo imunitním systému. Přídavkem PUFA do krmiva se dá snadno ovlivnit i jejich množství ve vejcích (Zelenka a kol., 2007). Jako jediná s esenciálních mastných kyselin se normuje kyselina linolová, pro kterou se uvádí hodnota 15 g do 45 týdnů věku a 14 g nad 45 týdnů věku v 1 kg krmné směsi při denní spotřebě 115 g krmiva. Jako nejvhodnějším zdrojem PUFA se podle poměru n-6 a n-3 uvádí olej řepkový (cca 2:1), který však nemá tak vysoký celkový obsah. Neméně vhodným je sójový olej (cca 7:1), který má celkový obsah PUFA vyšší (Zelenka, 2014). Zastoupení mastných kyselin je uvedeno na Obrázku 7.

Code	INFIC Int. feed number	Product	Fatty acid (% of Fat, as Methylester)							AMEn/kg dry matter	
		C	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	kcal	MJ
15000		**VEGETABLE OILS**									
15001	4-09-320	Coconut oil	44	15	8	2	8	3	1	8500	35.55
15002	4-07-882	Maize oil			10	2	26	58	1	9000	37.65
15003	4-24-950	Olive oil			13	3	63	16	2	8500	35.55
15004	4-	Palmkernel fat	51	15	8	2	16	1		8500	35.55
15005	4-	Palm oil		1	41	5	37	11		8000	33.45
15006	4-30-294	Rapeseed oil			5	2	51	24	8	8500	35.55
15007	4-20-526	Safflower oil			7	3	13	75	1	9000	37.65
15008	4-07-983	Soya oil			11	5	23	53	7	9000	37.65
16000		**ANIMAL FATS**									
16001	4-00-375	Blended animal fat 1*		2	21	13	38	9	1	8500	35.55
16002	4-00-375	Blended animal fat 2**		2	21	15	38	6	1	8000	33.45
16003	4-09-319	Poultry fat		1	18	5	42	20	1	9000	37.65
16004	4-95-306	Beef tallow		2	23	17	32	4	1	7000	29.30
16005	4-04-790	Lard		2	23	13	35	8	1	8500	35.55

Obrázek 7: Srovnání rostlinných a živočišných tuků a procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v nihc obsažených (Nutrition of the European federation of branches of the World's poultry Science Association, 1989)

4 Metodika

4.1 Design experimentu

4.1.1 Průběh experimentu

Nosnice byly rozděleny do tří skupin podle receptur jednotlivých kompletních krmných směsí (KKS). Jednotlivé receptury jsou uvedeny v Tabulkách 4–9. V první směsi byly obsaženy sójové výlisky (SV), ve druhé plnotučná sója (PS) a ve třetí skupině sójový extrahovaný šrot (SEŠ). Poslední skupina představovala kontrolní skupinu. V rámci jednotlivých skupin byly nosnice rozděleny do čtyř klecí po deseti kusech. Slepice byly ustájeny v obohacených klecových systémech, které splňují welfare zvířat a podmínky vycházející z vyhlášky 208/2004 Sb. Do experimentu byli zařazeni nosnice hnědovaječného hybrida Dominant D 102. Tento hybrid je výsledkem křížení Rodajlendky bílé po mateřské linii a Rodajlendky červené po otcovské linii. Podle dat uvedených státním podnikem Mezinárodní testování drůbeže v Ústrašicích, se roční produkce pohybuje okolo 320 ks vajec a průměrná hmotnost vejce je 64,3 g. Celý experiment začal ve 20. týdnu života nosnic, přičemž jednotlivé ukazatele užitkovosti začaly být sledovány až ve 29. týdnu, až se dostatečně ustálí příjem a snáška. Na přelomu 39. a 40. týdne došlo k přechodu z N1 krmné směsi na N2 krmnou směs. Experiment byl ukončen v 59. týdnu života nosnic. Vzorky byly po odebrání ihned uskladněny při –20 °C. Teplota prostředí se pohybovala v rozmezí 18–20 °C, relativní vlhkost pak 50–60 %. Od věku 26. týdnů se nosnicím svítilo 16 hodin, zbylých 8 hodin byla nepřetržitá tma. Intenzita osvětlení dosahovala 5–10 luxů. Slepice měli rovněž nepřetržitý přísun k čerstvé vodě a krmeni byly kompletní krmnou směsí ad libitum.

4.1.2 Krmné směsi

Receptury kompletních krmných směsí byli vytvořeny v softwaru Optimix (Biofaktory Praha s.r.o.) a jednotlivé složení je rozepsané v Tabulkách 5–8 v samostatných přílohách, včetně složení využitého premixu. Norma pro krmné směsi N1 byla nosnice od 20. do 42. týdně věku a pro směsi N2 nosnice od 43. do 59. týdně věku.

4.2 Laboratorní rozbory vaječných žloutků

4.2.1 Chemické látky

Veškerá použitá činidla měla čistotu dosahující analytických hodnot, přičemž kvalita u organických roztoků odpovídala HPLC nárokům. Acetonitril byl zakoupen od firmy Chromservis (CZ). Methanol pocházel z P-Labu (CZ). Ostatní organická činidla 2,6-di-tert-butyl-p-kresol (BHT), 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH, s obsahem vody 35 %), 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP, 99% koncentrace) a kyselina trichloroctová (TCA) pocházela z firmy Sigma-Aldrich (Praha, CZ).

4.2.2 Příprava chemikálií

Pro přípravu roztoku jako MDA standardu bylo potřeba 20 ml kyseliny chlorovodíkové (HCl) o 0,1M koncentraci, která byla přidána ke 34 μl TMP. Následně byl roztok ponechán v inkubaci po dobu 1 h při 40 °C, aby proběhla hydrolýza TMP na MDA, přičemž výsledná koncentrace byla 0,01 M. Koncentrace MDA v roztoku standardu byla změřena adsorbancí při vlnové délce 245 nm, která činila 0,174. Poté byla dopočítána hodnota koncentrace MDA 1,986 μg/ml. Tento výsledný standard byl uložen na tmavém místě a skladován při teplotě 1–2 °C.

Derivatizační činidlo bylo připraveno rozpuštěním 5 mg DNPH v 5 ml HCl o koncentraci 4 M. Takto připravený roztok DNPH byl skladován na zatemněném místě při teplotě –10 °C. Před samotným použitím tohoto roztoku při analýze byl po dobu 5–10 minut za nepřístupu světla intenzivně promícháván.

4.2.3 Pracovní postup přípravy vzorků na analýzu

Vzorky zmražených vaječných žloutků byly naváženy na analytických vahách, přičemž navážky se pohybovaly okolo 0,5 g materiálu. Následovala saponifikace pomocí 1 ml 1M hydroxidu draselného (KOH) a 10 μl 0,02M BHT v methanolu. Tato směs byla vložena do zkumavky, která byla zalepena a poté ponechána ve vodní lázni za nepřístupu světla při teplotě 60 °C po dobu 1 h v nepřetržitě se třesoucím stojanu. Po uplynutí 1 h byly vzorky vyjmuty z lázně a ponechány, aby vychladly. Následovala acidifikace pomocí koncentrované HCl na hodnotu pH 2. Poté došlo k odstředění pevného podílu na odstředivce při teplotě 4 °C 10 minut (otáčky 4000 rpm). Následně se odebral supernatant a přidalo se derivatizační činidlo 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH) (derivatizační činidlo se připravuje čerstvé navážením 5 mg DNPH do 5 ml 4M HCl). Výsledná směs byla intenzivně promíchána a ponechána při teplotě 50 °C po dobu 1 h na tmavém místě. Následně proběhla analýza pomocí kapalinového chromatografu.

4.2.4 Chromatograf

Tabulka 4: Gradient mobilní fáze, která byla použita pro analýzu MDA-DNPH. Rozpouštědlo A = voda : acetonitril (95:5), Rozpouštědlo B = acetonitril (100%). Maximální tlak dosažitelný tímto systémem byl 30 MPa.

POUŽITÁ KOLONA: PHENOMENEX C18 – SYNERGI 2,5 MM, HYDRO-RP, 100 Å, 100 MM X 3 MM			
Čas (min)	**Průtok (ml/min)**	**Složení (%)**	
		Rozpouštědlo A	**Rozpouštědlo B**
0	0,55	90,0	10,0
24,0	0,55	90,0	10,0
26,0	0,55	68,5	31,5
28,0	0,6	65,0	35,0
46,0	0,62	64,0	36,0
47,0	0,65	1,0	99,0
52,0	0,7	1,0	9930

K analýze byl použit HPLC chromatograf SHIMADZU 30 AC s kolonou phenomenex C18 – Synergi 2,5 μm, Hydro-RP, 100 Å, délky 100 mm, vnitřní průměr 3 mm) (viz Tabulka 4), s fotodiodovým detektorem (303 nm pro detekci), odplynovačem DGU-20A_5 a gradientovou elucí acetonitril/voda. V Tabulce 11 je detailně popsán gradient použité mobilní fáze.

4.2.5 UV-VIS spektrofotometr

Při měření absorbance při vlnové délce 245 nm v oblasti UV pro zjištění koncentrace námi připraveného standardu MDA byl použit spektrofotometr Libra S22 (Biochrom Ltd.).

4.2.6 Statistické a grafické zpracování dat

Pro výstup základních popisných charakteristik a pro určení statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl použit software Statistica 12 (StatSoft ČR s.r.o.), konkrétně metoda analýzy rozptylu (ANOVA s interakcemi) s využití Tuckeyovy metody. Pro grafický výstup koncentrace MDA ve žloutcích byla využita metoda nejmenších čtverců (MNČ). Pro grafické znázornění průměrných hodnot byl využit Microsoft Excel.

5 Výsledky

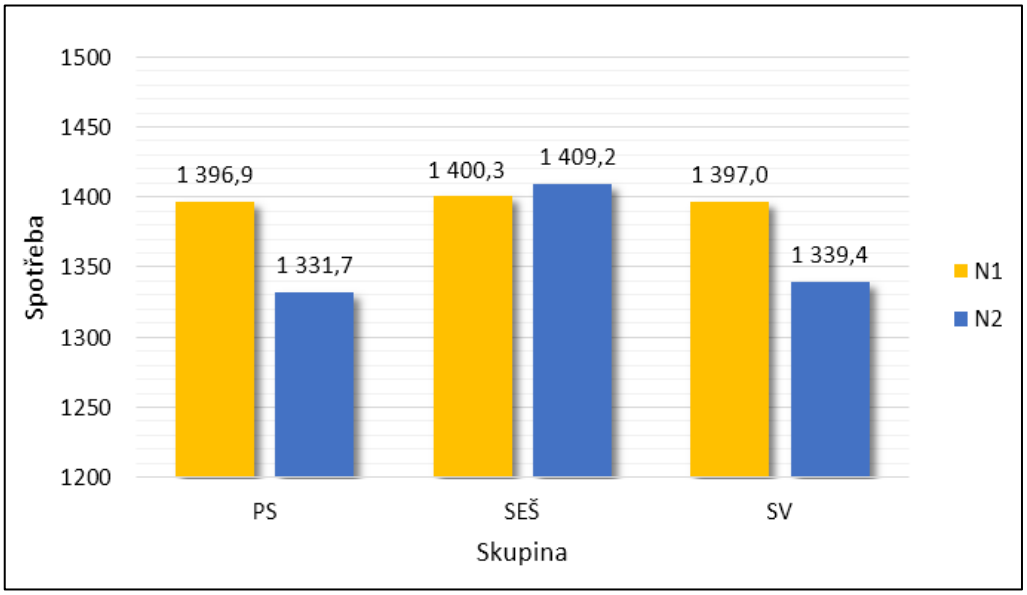
V rámci tohoto experimentu probíhalo měření šesti ukazatelů užitkovosti – denní spotřeba krmiva na klec, spotřeba krmiva na kus a krmný den, snáška za období na klec, spotřeba krmiva na jedno vejce, intenzita snášky a hmotnost vajec. Posledním parametrem byla koncentrace MDA ve vaječných žloutcích.

Základní popisné charakteristiky všech ukazatelů jsou uvedeny v samostatných přílohách, které jsou rozděleny podle KS N1 a N2.

Hodnoty pro průměrnou denní spotřebu krmiva N1 a N2 na klec jsou uvedeny v Tabulkách 9 a 11. Rozdíly pro N1 směs byly minimální, nicméně nejvyšší průměrnou hodnotu spotřeby krmiva na klec měla kontrolní skupina SEŠ (1400,3 ± 20,47 g), poté následovala skupina SV (1397,0 ± 20,10 g). Naopak nejnižší průměrnou hodnotu měla skupina PS (1396,9 ± 19,28 g). Pro N2 směs měla s větším rozdílem opět nejvyšší průměrnou hodnotu skupina SEŠ (1409,2 ± 20,03 g), ale jak je patrné z Tabulky 13, rozdíl oproti ostatním skupinám nebyl statisticky významný ($p>0,05$). Druhou nejvyšší hodnotu vykazovala skupina SV (1339,4 ± 25,94 g) a nejnižší skupina PS (1331,7 ± 21,47 g). Grafické zpracování hodnot pro spotřebu krmiva na klec je uvedeno v Grafu 1. Z grafu je rovněž patrné, že u kontrolní skupiny prakticky nebyl rozdíl mezi směsí N1 a N2. U zbylých skupin převažovala spotřeba N1, nicméně z Tabulky 13 je patrné, že rozdíly nebyly statisticky významné ($p>0,05$).

Graf 1: Průměrná denní spotřeba krmiva N1 a N2 na klec mezi jednotlivými skupinami.

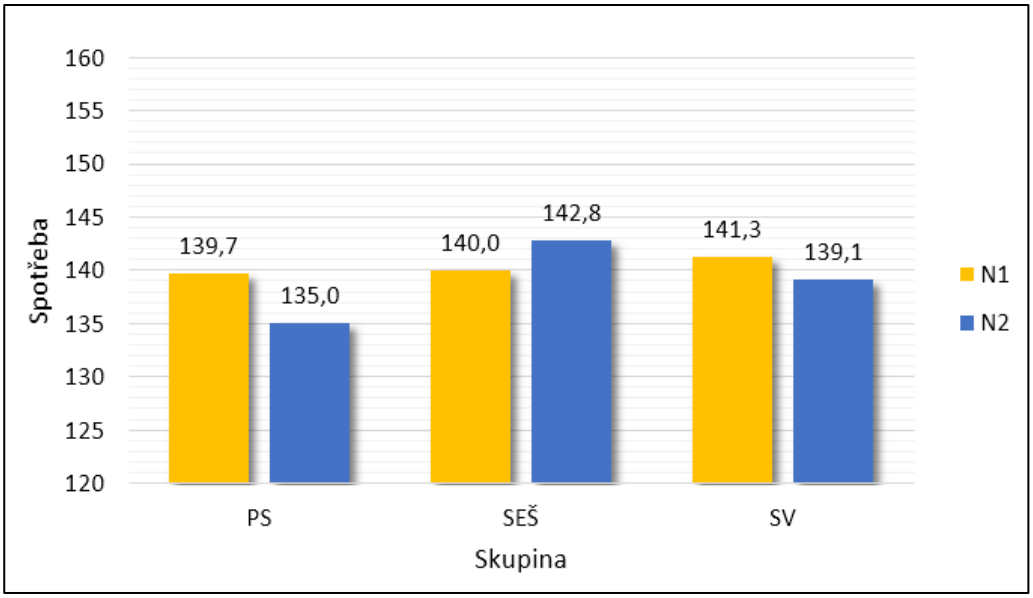
Hodnoty jsou uvedeny v gramech.



U parametru spotřeba KD na kus a krmný den byly výsledky pro N1 směs relativně vyrovnané. Nejvyšší hodnota byla zjištěna pro skupinu SV (141,3 ± 2,10 g), následovala skupina SEŠ (140,0 ± 2,05 g) a nejnižší průměrná hodnota byla zaznamenána pro PS (139,7 ± 2,31 g). Pro N2 směs dosahovala nejvyšší průměrné hodnoty skupina SEŠ (142,8 ± 2,06 g), skupina SV dosáhla průměrné hodnoty 139,2 ± 2,65 g a nejnižší hodnotu měla opět skupina PS (135,0 ± 2,22 g). Grafické zpracování pro tento parametr je uvedeno v Grafu 2 a hodnoty pro N1 a N2 směsi jsou uvedeny v Tabulkách 9 a 11. Z Tabulky 14 je patrné, že nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami (p>0,05), a to jak u směsi N1, tak i u směsi N2.

Graf 2: Průměrná denní spotřeba krmiva N1 a N2 směsi na kus a krmný den mezi jednotlivými skupinami.

Hodnoty jsou uvedené v gramech.



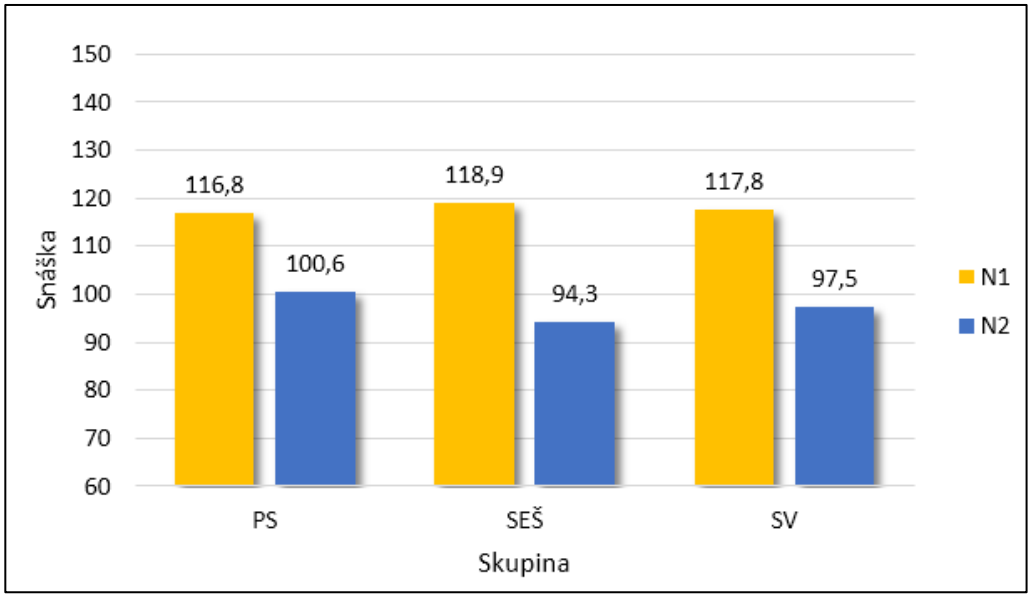
Při krmení N1 směsí byly hodnoty pro snášku na klec za období mezi skupinami téměř vyrovnané. Nejvyšší průměrná hodnota 118,9 ± 1,12 ks byla zjištěna pro skupinu SEŠ, následovala skupina SV (117,8 ± 1,60 ks) a nejnižší hodnoty vykazovala skupina PS (116,8 ± 1,56 ks) a celkově byly průměrné hodnoty výrazně vyšší – viz Tabulka 9 a Graf 3. Naopak během krmení N2 došlo celkově k poklesu snášky u všech skupin, přičemž nejvyšší průměrná snáška byla zaznamenána u skupiny PS (100,3 ± 1,95 ks), za ní následovala skupina SV s průměrnou hodnotou 97,5 ± 2,19 ks a nejnižší naopak u SEŠ (94,3 ± 1,87 ks). V rámci KS N1 a N2 se mezi skupinami nevyskytovaly statisticky významné rozdíly (p>0,05) – viz Tabulka 15.

Průměrná hodnota spotřeby krmiva na jedno vejce mezi skupinami byly pro N1 směsi vyrovnané bez větších rozdílů. Nejvyšší průměrnou hodnotu dosáhla skupina PS (168,2 ± 3,70 g), následovala skupina SV (166,4 ± 1,50 g) a poslední byla skupina SEŠ (165,3 ±1,20 g). Naopak u N2 směsi měla nejvyšší hodnotu skupina SEŠ (214,9 ± 4,34 g), což koreluje se snáškou, která byla u SEŠ skupiny nejnižší. Druhou v pořadí byla skupina SV (197,9 ± 5,14

g) a poslední skupina PS (189,6 ± 4,60 g), což opět odpovídá pořadí v parametru snáška za období na klec. Nižší hodnoty v první polovině snáškového cyklu, a naopak vyšší hodnoty v druhé polovině korelují s průměrnou snáškou, která byla v první polovině vyšší a ve druhé naopak nižší. Obojí je patrné z Grafu 3 a 4. Průměrné hodnoty jsou dále uvedeny v Tabulce 10 a 12. Rozdíly v rámci krmných směsí N1 a N2 byly mezi skupinami vyhodnoceny jako statisticky nevýznamné (p>0,05) – viz Tabulka 16.

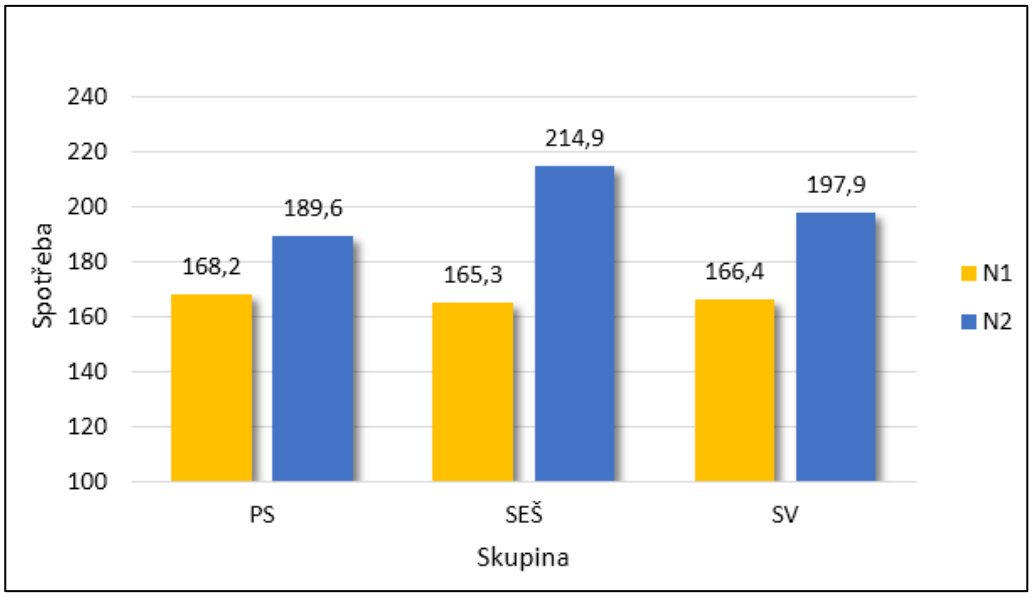
Graf 3: Průměrné hodnoty snášky na klec za období 14 dnů pro N1 a N2 směs.

Hodnoty jsou uvedeny v kusech.



Graf 4: Průměrná spotřeba krmných směsí N1 i N2 na jedno vejce

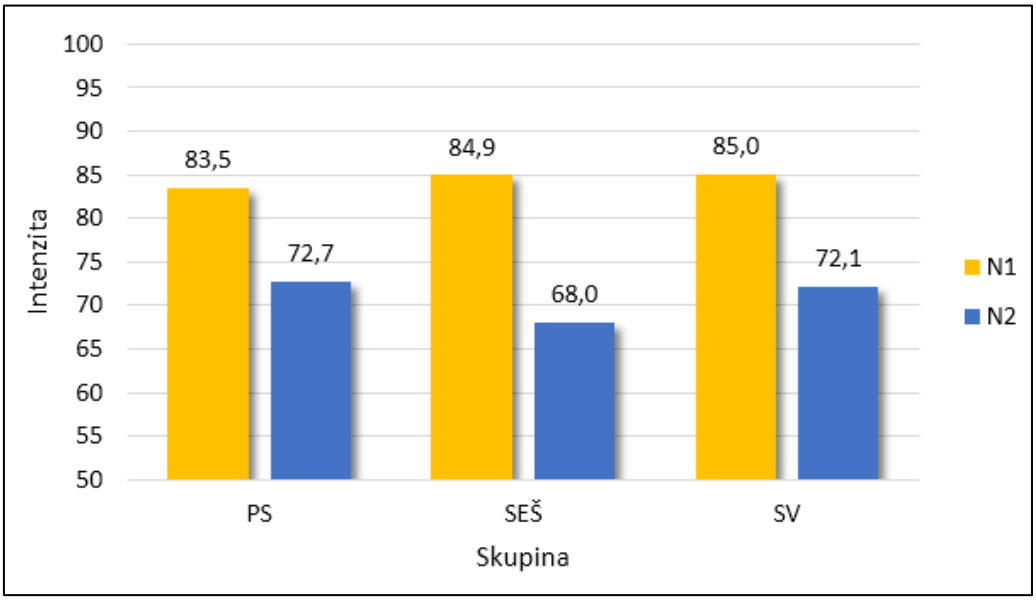
Hodnoty jsou uvedeny v gramech.



Intenzita snášky vyjadřuje procentuální hodnotu počtu snesených vajec na krmné dny. Z Grafu 5 je patrné, že rozdíly mezi skupinami i mezi N1 a N2 směsmi odpovídají hodnotám snášce na klec (Graf 3). Rozdíly v rámci N1 byly minimální, nicméně nejvyšší intenzity během krmení N1 dosahovala skupina SV (85,0 ± 1,06 %), následovala skupina SEŠ (84,9 ± 0,80 %) a poslední byla skupina PS (83,5 ± 1,11 %). U N2 dosahovaly rozdíly mezi skupinami opět nízkých hodnot – nejvyšší intenzita pro PS (72,7 ± 1,31 %), dále SV (72,1 ± 1,35 % a nejnižší SEŠ (68,0 ± 1,23 %). Intenzita snášky byla výrazně vyšší během krmení N1 směsmi. Jak je patrné z Tabulky 17, mezi skupinami se nevyskytovaly signifikantně průkazné rozdíly ($p>0,05$).

Graf 5: Intenzita snášky mezi skupinami

Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech.

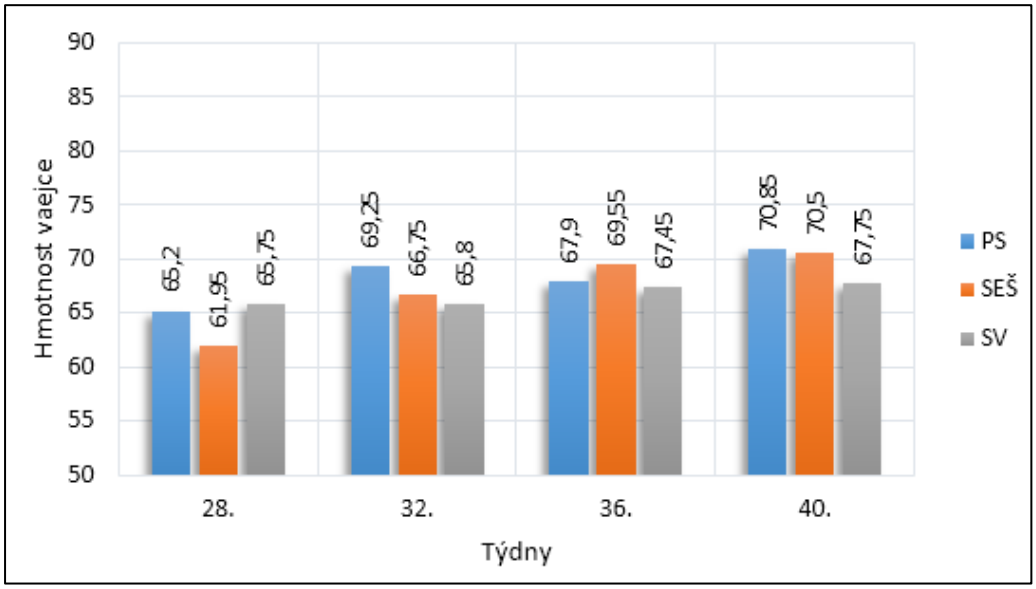


Posledním sledovaným parametrem užitkovosti byla hmotnost vajec (HMV). Vývoj průměrné hmotnosti vajec mezi 28. až 40. týdnem života nosnic ukazuje Graf 6. Z grafu je patrné, že s postupujícím snáškovým cyklem se hmotnost vajec nepatrně zvyšuje u všech skupin s výjimkou měření ve 36. týdnu, kdy došlo ve skupině s PS o snížení průměrné HMV o 1,35 g. Během krmení N1 směsmi vykazovala nejvyšší průměrnou HMV skupina PS (68,3 ± 0,48 g), následovaná skupinou SEŠ (67,2 ± 0,50 g) a nejnižší hodnoty vykázala skupina SV (66,7 ± 0,50 g). Průměrná hmotnost vajec byla vyšší v druhé polovině snáškového cyklu – pro skupinu PS byla zjištěna opět nejvyšší hodnota (73,0 ± 0,50 g), další v pořadí byla skupina SEŠ (72,0 ± 0,49 g) a poslední SV (69,8 ± 0,44 g). Průměrné hodnoty pro HMV jsou uvedeny v Tabulkách 10 a 12. Z grafu 7 je patrné, že druhou polovinu snáškového cyklu provázelo snižování hmotnosti vajec, nicméně pokles nebyl u všech skupin tak jasný jako růst během

první poloviny. Z hodnot Tabulky 18 vyplývá, že mezi skupinami nebyly zjištěny signifikantní rozdíly (p>0,05).

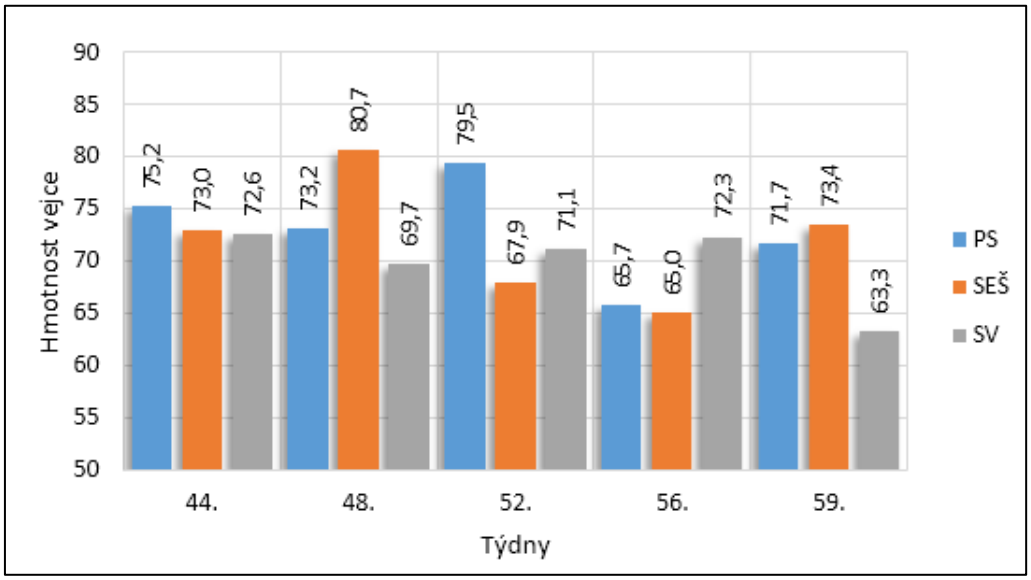
Graf 6: Vývoj průměrné hmotnosti vajec mezi 28. a 40. týdnem věku nosnic – N1 směs.

Hodnoty jsou uvedeny v gramech.



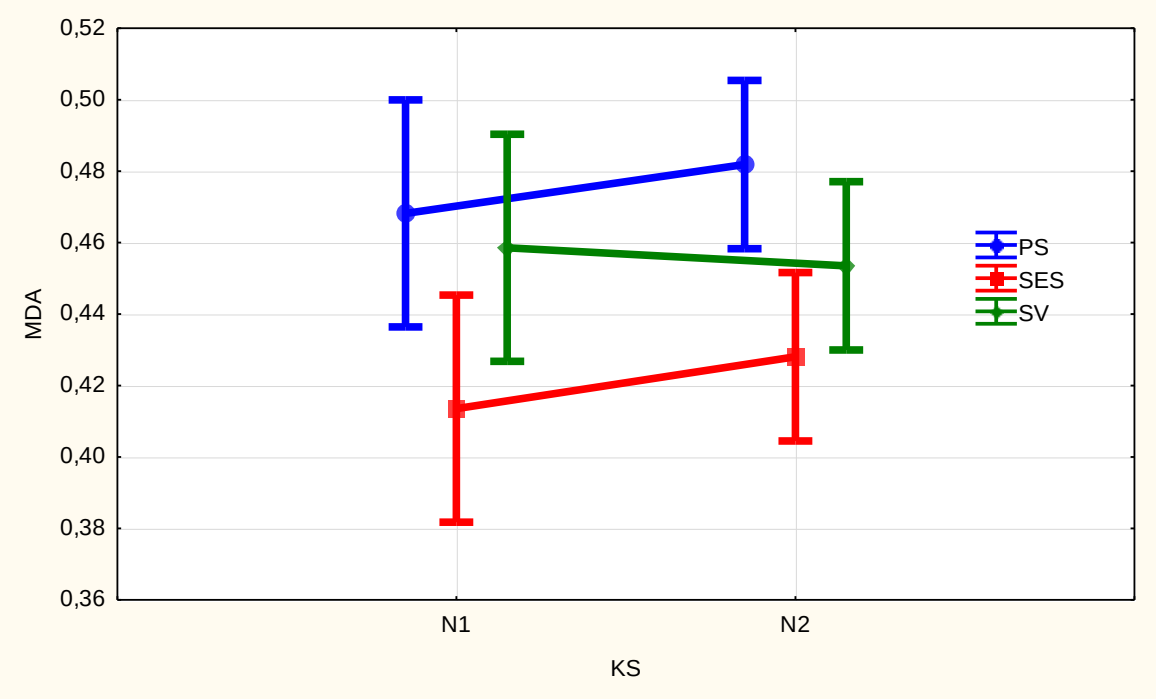
Graf 7: Vývoj průměrné hmotnosti vajec mezi 44. a 59. týdnem věku nosnic – N2 směsi.

Hodnoty jsou uvedeny v gramech.



Posledním a nejdůležitějším parametrem zkoumání byla koncentrace MDA v odebraných vaječných žloutcích. Z hodnot uvedených v Tabulce 10 je patrné, že nejvyšší průměrnou koncentraci MDA pro N1 směs měla skupina PS (0,468 ± 0,02 mg/kg), poté následovala skupina SV (0,459 ± 0,02 mg/kg) a naopak nejnižší byla SEŠ (0,414 ± 0,02 mg/kg). Hodnoty uvedené v Tabulce 12 udávají stejné pořadí skupin – skupina PS (0,482 ± 0,012 mg/kg) měla nejvyšší hodnotu koncentrace MDA, jako druhá byla vyhodnocena SV (0,456 ± 0,01 mg/kg) a naopak nejnižší průměrná hodnota byla zjištěna u skupiny SEŠ (0,428 ± 0,01 mg/kg). Grafické znázornění průměrných hodnot a rozptylů je zobrazeno v Grafu 8. Jediný statisticky významný rozdíl byl zjištěn při krmení N2 směsmi mezi kontrolní skupinou a PS (p=0,022357), mezi ostatními skupinami se průkazné rozdíly nevyskytovaly (p>0,05). Výsledky tohoto statistického zpracování jsou uvedeny v Tabulce 19.

Graf 8: Průměrné hodnoty koncentrace MDA pro KS N1 i N2. Hodnoty MDA jsou uvedeny v mg/kg.



6 Diskuze

Jak je patrné z Tabulky 13 a 14, spotřeba krmiva na klec i spotřeba na kus za krmný den nebyla v našem případě významně statisticky ovlivněna složením KS, respektive množstvím energie. V tomto případě naše výsledky korespondují s výsledky Ceylan et al. (2011) a Muangkeowa (2011). V případě navyšování energetického potenciálu krmiva tukem, což je ve výživě drůbeže běžná praxe, dochází zároveň ke zvyšování obsahu kyseliny linolové, která hraje ve výživě velmi důležitou roli. V těchto případech je tedy složité určit, zda se jedná o efekt způsobený navýšením nebo naopak snížením množství tuku či právě zmíněné kyseliny linolové, poněvadž tyto dva faktory nemohou být odděleny. Procentuální navýšení obsahu kyseliny linolové závisí na zdroji tuku, jelikož jednotlivé tuky se liší

zastoupením mastných kyselin, jak je uvedeno na Obrázku 7. Tuto teorii zmiňuje i Pérez-Bonilla et al. (2012a) a Pérez-Bonilla et al. (2011), kteří dosáhli stejných výsledků. Pérez-Bonilla et al (2012a) rovněž uvádí možnost, že v případě navýšení obsahu kyseliny linolové výrazněji nad minimální požadavky (2,5 %), již nemá požadovaný pozitivní efekt. V našem případě mohou být statisticky nevýznamné výsledky způsobeny příliš nízkými rozdíly, a to jak v celkovém obsahu energie či v množství kyseliny linolové. Jelikož drůbež je schopna regulovat příjem krmiva právě na základě jeho energického potenciálu, platí předpoklad, že se zvýšeným množstvím energie se bude zároveň snižovat příjem krmiva. Tuto domněnku podporují i výsledky experimentů Pérez-Bonilla et al. (2012b) či Yuan et al. (2019). A právě výše zmíněné nedostatečné rozdíly v obsahu tuku, mohou hrát klíčovou roli ve spotřebě krmiva. Z výsledků Heydari et al. (2009) je patrné, že minimální rozdíl v navýšení tuku k dosažení signifikantních výsledků ve spotřebě krmiva jsou 2 % (z 0 na 2 %). Minimální navýšení o 3 % obsahu tuku v krmivu (z 0 na 3 %) potřeboval k průkazným výsledkům Hoan a Khoa (2016). Pro Yuan et al. (2009) a Gül et al. (2012) bylo potřeba pro statisticky významné rozdíly potřeba zvýšit množství tuku o 3,35 %, respektive o 4 %. To, jak je drůbež schopna regulovat svůj denní příjem krmiva na základě své energetické potřeby, podporují i výsledky pokusu Kim et al. (2019). V tomto případě byl pozorován nárůst příjmu krmiva se zvýšeným obsahem tuku u nosnic, které byly ustájeny v nadměrně vyhřátých prostorách, přičemž energetická hodnota krmiva byla stejná jako u kontrolní skupiny. Autoři to vysvětlují tím, že ze všech tří makroživin (bílkoviny, sacharidy, tuky), vyprodukují tuky během trávení nejnižší množství tepla. I v našem případě se mezi KS vyskytovaly rozdíly v obsahu dusíkatých látek (NL), které by teoreticky mohly ovlivňovat příjem krmiva, nicméně statisticky nevýznamné rozdíly ve spotřebě krmiva v rámci různého obsahu NL vykazovaly i experimenty Yuan et al. (2009) a Pérez-Bonilla (2012a). Na základě výsledků se dá předpokládat, že u NL platí totéž, co u tuků. Je tedy zřejmě nutné, aby rozdíly v obsahu mezi směsmi dosahovaly vyšších hodnot. Pérez-Bonilla et al. (2012a) jako vysvětlení uvádí, že jakmile je dosaženo minimálních požadavků na množství NL, jejich navyšování již nemusí mít další vliv. Dalším důvodem může být fakt, že vyšší množství NL se vyskytuje u kontrolní skupiny a také u skupiny SV, přičemž obě skupiny vykazují zároveň nižší energetickou hodnotu oproti skupině PS.

Množství tuku a energie v našem případě signifikantně neovlivnilo parametry týkající se snášky (průměrná snáška na klec, intenzita snášky). Jak je patrné z Grafu 3 a 5, hodnoty mezi skupinami byly dost vyrovnané, což je patrné i z průměrných hodnot uvedených v Tabulkách 9–12. Stejných neprůkazných výsledků experimentů dosáhli i autoři Heydari et a. (2009), Yuan et al. (2009), Ceylan et al. (2011), Muangkeow (2011) a Pérez-Bonilla et al. (2012a). Důvodem pro minimální rozdíly mezi skupinami může být fakt, že vyšší množství přijaté energie z krmiva nosnice nevyužily na vyšší produkci vajec, nýbrž na zvyšování tělesné hmotnosti. Toto vysvětlení publikuje i Pérez-Bonilla et al. (2011), který došel ke stejným výsledkům. Bohužel tělesná hmotnost nosnic nebyla během našeho experimentu zaznamenávána, proto se tato teorie v našem případě nedá ověřit. V první části snáškového cyklu, při kterém se nosnicím podávala směs N1, byla u skupin PS a SV zjištěna vyšší spotřeba krmiva ($p>0,05$) oproti KS N2. Toto zjištění koreluje s intenzitou snášky a průměrnou snáškou na klec, která byla v první části snáškového cyklu u skupin PS a SV signifikantně vyšší ($p=0,00002$) než ve druhé části. U kontrolní skupiny však byla spotřeba

N1 a N2 vyrovnaná, přičemž z Tabulek 15 a 17 je patrné, že snáška se mezi částmi cyklu u kontrolní skupiny signifikantně lišila (p=0,00002). Vysvětlení pro tuto situace se může skrývat opět v narůstající tělesné hmotnosti nosnic ve druhé fázi cyklu, ale pravděpodobnější je, že nadbytečná energie se promítla do signifikantně vyšší průměrné hmotnosti vajec (p=0,00002) – viz Tabulka 18. Kim et al. (2019) zpozoroval, že během ustájení nosnic v nadměrně vyhřátých prostorách, při nižším množství tuku v krmivu, docházelo u kontrolní skupiny k výraznému snižování tělesné hmotnosti. Tento pokles hmotnosti nebyl doprovázen změnou v produkci vajec. Autor tuto situaci vysvětluje tak, že nosnice raději upřednostní produkci před udržením tělesné kondice. Jak je uvedeno v předešlém odstavci, v recepturách se vyskytovaly i rozdíly v množství NL, a ani tyto rozdíly se nepromítly do produkce vajec, stejně tak jako u experimentů autorů Yuan et al. (2009) a Pérez-Bonilla et al. (2012a). Dalo by se předpokládat, že při regulaci příjmu potravy na základě zvyšujícího se obsahu energie, nedojde k ovlivňování snášky. Nicméně Gül et al. (2012) zpozoroval, že při navyšování množství tuku o 4 %, dojde již k signifikantnímu snížení průměrné snášky a při navýšení o 6 % se tento rozdíl ještě prohloubí. Obdobné výsledky vykazoval i Hoan a Khoa (2016), přičemž těm stačilo ke statisticky významnému snížení pouze 3 % tuku navíc oproti kontrole. V obou případech byl samozřejmě pozorován pokles příjmu krmiva. Yuan et al. (2019) vykazoval rovněž snížení produkce vajec, a to při rozdílu pouze 2 % tuku a obdobně jako u předešlých autorů, toto snížení bylo v korelaci s regulací příjmu krmiva. K opačným výsledkům došel Pérez-Bonilla et al. (2012b), v rámci jehož experimentu došlo ke snižování příjmu krmiva (z 2650 kcal/kg na 2850(2950) kcal/kg), ale zároveň k nárůstu produkce vajec a to již při rozdílu 100 kcal/kg (z 2650 kcal/kg na 2750(2850) kcal/kg). Tento trend přestal až při navýšení na 2950 kcal/kg. Autor to vysvětluje tím, že takový nadbytek energie v krmivu již zvířata nejsou schopna převádět do vyšší produkce, nýbrž se nadbytečné množství energie projeví nárůstem tělesné hmotnosti. V různém stádiu snáškového cyklu (N1 vs N2) se vyskytovaly signifikantní rozdíly ve množství snesených vajec, nicméně různá intenzita snášky během probíhajícího snáškového cyklu je v praxi běžná věc (viz kapitola 3.5 Snáška a snáškový cyklus nosnic).

Spotřeba krmiva na vejce neboli konverze, je parametr, který se sám o sobě těžko ovlivňuje. Je totiž definován spotřebou krmiva a následnou snáškou, proto výsledky spotřeby krmiva na vejce jsou kombinací výsledků uvádějící spotřebu krmiva a následnou snášku. Vzhledem k tomu, že mezi skupinami nebyly prokázány statisticky významné rozdíly (p>0,05) u obou parametrů, nedá se předpokládat, že u spotřeby krmiva na vejce tomu bude jinak. Tuto domněnku podporují i výsledky Muangkeowa (2011). Naopak Yuan et al. (2009) prokázal, že signifikantní rozdíly ve spotřebě krmiva, vedou k signifikantním rozdílům v konverzi krmiva, a to již při rozdílu 1,67 % tuku. A to i přesto, že produkce vajec nebyla prokazatelně ovlivněna.

Podle Pérez-Bonilla et al. (2012a) je pro maximalizaci hmotnosti vajec nezbytné vybudovat před začátkem snáškového cyklu co největší tělesný rámec. V našem případě nedošlo k signifikantnímu ovlivnění HMV množstvím tuku v krmivu, nicméně z výsledků je patrné, že HMV v některých případech značně převýšila uváděné průměrné hodnoty u tohoto plemena (viz kapitola 4.1.1 Průběh experimentu). Vyšší množství energie tedy nebylo využito na vyšší hmotnost vajec, nýbrž pravděpodobně na zvyšování tělesné hmotnosti. K podobným závěrům došli i autoři Yuan et al. (2009), Muangkeow (2011) a Ceylan et al. (2011), kteří

rovněž nezpozorovali prokazatelnou změnu v HMV. Změny v tělesné hmotnosti bez změny průměrné HMV na základě vyššího příjmu energie zpozoroval Pérez-Bonilla et al. (2012a) i Kim et al. (2019), ale v jeho případě byl tento efekt způsoben příliš vyhřátými prostory. K zajímavým výsledkům došel Pérez-Bonilla et al. (2012b), který zpozoroval průkazné rozdíly ve spotřebě krmiva i v produkci, ale bez výrazných změn v hmotnosti vajec. Toto může být způsobeno dosažením maxima ve velikosti vajec u daného plemene. Autor se ještě zabývá myšlenkou, že pro dosažení maximálního efektu kyseliny linolové na velikost vajec, stačí dosáhnout obsahu 1,15 %, jak uvádí Grobas et al. (1999). Při následném navyšování jejího obsahu tukem, již nehraje roli obsah právě této kyseliny, nýbrž samotného tuku, potažmo množství energie. V jeho případě tento limit dosahovala již kontrolní skupina (1,35 %), a i přesto následné navyšování množství tuku nemělo na HMV vliv. Podle návodu Lohmanna (2010) na výživu nosnic je nutné pro maximalizaci efektu kyseliny linolové na velikost vajec, dosáhnout obsahu alespoň 1,8 %. Pérez-Bonilla et al. (2011) vysvětluje tyto lišící se hodnoty použitými rozdílnými dietami a rovněž tvrdí, že v praxi nelze úplně určit, zda se jedná o vliv kyseliny linolové či tuku. V našem případě bylo dosaženo hranice 1,8 % kyseliny linolové pouze v případě skupiny PS. Tuto teorii podle Lohmanna (2010) potvrdil svými výsledky Heydari et al. (2009), který zpozoroval signifikantní nárůst HMV na základě zvýšeného obsahu kyseliny linolové (z 1,28 na 1,8 %), přičemž další zvýšení kyseliny linolové na 2,25 % zvýšení nepřineslo. Naopak Hoan a Khoa (2016) vykázali v rámci svého experimentu, že navyšování množství sezamového oleje v krmivu (z 0 na 3 %), vede ke snižování HMV navzdory tomu, že sezamový olej je bohatý na obsah kyseliny linolové. Snížení HMV při navyšování řepkového oleje (z 0 na 4 %) pozoroval i Gül et al. (2012), nicméně tento výsledek by se dal vysvětlit nižším obsahem kyseliny linolové v řepkovém oleji. K podobným závěrům došel i Yuan et al. (2019), který rovněž navyšoval obsah řepkového oleje v dietě (z 0 na 2 % a ze 2 na 4 %). Nobakht et al. (2011) publikoval výsledky, ve kterých nejvyšší HMV dosáhl u skupiny krmené dietou, ve které bylo obsaženo 2 % řepkového a 2 % slunečnicového oleje. I přesto, že nejsou známy konkrétní obsahy kyseliny linolové mezi skupinami, ze složení ostatních diet je patrné, že skupiny vykazovaly vyšší obsah této kyseliny. Z Tabulky 18 je patrné, že se v různé fázi snáškového cyklu (N1 vs N2) vyskytovaly průkazné rozdíly ve HMV. Tyto výsledky však nelze srovnávat vzhledem k různému stáří nosnic.

Výsledky měření koncentrace MDA v rámci našeho experimentu prokázaly, že vyšší množství tuku bohatého na PUFA způsobuje nižší oxidační stabilitu lipidů, což má za následek vznik zdraví škodlivých sekundárních produktů. Toto tvrzení podporují i výsledky Daza et al. (2005), Lunda et al. (2008) a Güla et al. (2012). Naopak Cardenia et al. (2011) došel ke statisticky neprůkazným závěrům. Vysvětlení se může skrývat v příliš nízkých rozdílech v obsahu PUFA mezi dietami. Naše výsledky odpovídají i závěrům experimentu Dordeviče et al. (2016), který prokázal, že přídavek lněného oleje bohatého na n-3 MK a zároveň chudšího na obsah n-6 PUFA má za následek signifikantně nižší koncentraci MDA ve hřbetním tuku prasat. Nižší koncentrace MDA byla zjištěna ve všech měřeních (po 3, 6, 9 a 12 měsících při –20 °C skladování) oproti vzorkům z diet bohatých na PUFA. Tyto výsledky jsou však v kontrastu se závěry Kinga et al. (2012), který naopak pozoroval nejnižší oxidační stabilitu u vzorků bohatých na n-3. V případě Okrouhlé et al. (2018) nebyla prokázána spojitost s vyšším obsahem PUFA a následnou vyšší náchylností k oxidaci. Podle autorky by

za neprůkaznost výsledků mohl být zodpovědný vyšší obsah kyseliny olejové obsažený v sójovém a řepkovém oleji, která má schopnost částečně inhibovat oxidaci lipidů. Podíl na výsledek by také mohly mít látky jako fosfolipidy, přirozené antioxidanty, cholin či vitamin E, které zabraňují oxidaci a vyskytující se právě v sójovém oleji. Tato domněnka o vlivu olejové kyseliny by mohla mít vliv i na naše měření, jelikož oba zdroje tuků se v recepturách vyskytovaly (řepkový pouze u kontrolní skupiny). Zvýšení oxidační stability kyselinou olejovou se mohlo uplatnit i při experimentu Kinga et al. (2012), jež pozoroval nejnižší koncentraci MDA u vzorků pocházející od nosnic, krmených dietou se slunečnicovým olejem obohaceným právě kyselinou olejovou. Nejvyšší oxidační stabilita byla pozorována i navzdory tomu, že téže dieta obsahovala ze všech diet nejvíce kyseliny linolové. V případě Okrouhlé et al. (2018) bylo zároveň zjištěno, že čím déle byly vzorky uskladněny, tím vyšší stupeň oxidace vykazovaly. V našem případě nedocházelo ke zjišťování vlivu různě dlouhé doby skladování, poněvadž vzorky byly odebírány postupně u všech skupin během probíhajícího snáškového cyklu, nicméně od každé skupiny byl odebrán ve stejný den a ihned uskladněn, tudíž rozdíly nemohly být způsobeny tímto faktorem. Stejně tak Criste et al. (2018) zjistil, že nejvyšší hladinu MDA ve žloutcích po různou dobu skladování (0, 20 a 40 dní při 2–4 °C) obsahují vzorky od nosnic krmených dietou s nejvyšším obsahem kyseliny linolové a nejnižší koncentrací antioxidantů (α-tokoferol). Podobně jako Dordevič et al. (2016) autor zpozoroval, že s prodlužující se dobou skladování se koncentrace MDA zvyšuje a zároveň dochází ke snižování množství antioxidantů. To podporují i výsledky Daza et al. (2005), Popa et al. (2013) a Wanga et al. (2017). Toto zjištění podporuje předpoklad, že antioxidanty zabraňují oxidaci lipidů během skladování (Hayat et al. 2010). V případě Güla et al. (2012) došlo k signifikantnímu zvýšení oxidace lipidů mezi 21. a 42. dnem skladování pouze u kontrolní skupiny, která obsahovala 2 % sójového oleje. Efekt antioxidantů byl prokázán částečně u Daza et al. (2005), jelikož signifikantně nižší koncentrace MDA byla zjištěna pouze pro skladování po dobu 3 dnů, přičemž pro 6 a 9 dnů již nikoli. Podle Hernandéze-Lópeze et al. (2016) má vyšší množství antioxidantů v krmivu dokonce takový vliv, že způsobí prokazatelně nižší úroveň oxidace lipidů i v případě, že se v dané dietě vyskytuje více PUFA. Nicméně v tomto experimentu byl přidáván do krmiva odpad ze zpracování avokáda, jež je bohaté především na kyselinu olejovou, jejíž vliv na oxidaci byl již zmíněn. V případě Cardenia et al. (2011) došlo sice při využití antioxidantů (α-tokoferol acetát) ke snížení úrovně oxidace, nicméně neprůkazně. Podle autora může hrát roli i výběr zvířat (věk, pohlaví či plemeno), množství krmení, podmínky jatek apod. Role antioxidantů byla v rámci našeho experimentu eliminována tím, že všechny KS obsahovaly stejné množství identického premixu s antioxidanty butylhydroxytoluen a butylhydroxyanisol. Zajímavý faktor ovlivňující oxidační stabilitu zpozoroval Daza et al. (2005). V tomto případě došlo k naměření signifikantnímu navýšení MDA u vzorků hřbetního sádla prasat, jež byly chovány stylem volného chovu. Autor to vysvětluje vyšším obsahem myoglobinu na základě větší fyzické aktivitě zvířat. Tuto teorii potvrzují i Okabe et al. (2002) a Yang et al. (2002). Signifikantní rozdíly v oxidační stabilitě byly v našem případě rovněž pozorovány mezi skupinami krmenými směsmi N1 a N2, respektive v jiném období snáškového cyklu. Tyto výsledky vzhledem k jinému věku nosnic, jiným KS, různě dlouhé době skladování a jiné fázi snáškového cyklu nelze porovnávat.

Vezmeme-li tedy v úvahu, že producent vajec bude chtít produkovat vejce s vyšší oxidační stabilitou, než tomu bylo v případě diety s plnotučnou sójou. Má tedy na výběr ze dvou dalších variant, přičemž obě mají ve výsledku na oxidační stabilitu stejný vliv. Z Tabulek 5 a 7 je patrné, že dražší je kontrolní směs se sójovým extrahovaným šrotem (N1 i N2), a to z důvodu nutnosti využití řepkového a sójového oleje pro doplnění energie a kyseliny linolové. Vzhledem k tomu, že mezi oběma skupiny nebyl prokazatelný rozdíl ani ve spotřebě ani ve snášce či HMV, bylo by z ekonomického hlediska určitě výhodnější využít dietu se sójovými výlisky.

7 Závěr

Cílem práce bylo zjistit, zdali diety s obsahem sójových výlisků nebo plnotučné extrudované sóji mají ve srovnání s dietou obsahující sójový extrahovaný šrot efekt na oxidační stabilitu vaječných žloutků. V případě kontrolní skupiny bylo potřeba dietu doplnit kyselinu linolovou, aby její obsah dosahoval minimálních norem.

Nosnice byly rozděleny do tří skupin, přičemž každá skupina se skládala ze 4 obohacených klecí, ve kterých se vyskytovalo vždy 10 nosnic. Celý experiment trval 40 týdnů a vzorky pro hodnocení užitkovosti a následnou analýzu oxidační stability byly sbírány po dobu 31 týdnů a následně zamrazeny. Následovala analýza pomocí kapalinového chromatografu a statistické vyhodnocení.

U spotřeby krmiv nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi skupinami, a to ani při srovnání v různém stádiu snáškového cyklu. V počtu snesených vajec se rovněž nevyskytovaly signifikantní rozdíly mezi skupinami. Vzhledem k tomu, že spotřeba na vejce vychází z předchozích dvou parametrů, tak ani v tomto případě významné rozdíly nebyly pozorovány. Ani průměrná hmotnost vajec nebyla v našem případě mezi skupinami ovlivněna krmnou směsí. Pouze u měření oxidační stability došlo ke zjištění statisticky významných rozdílů mezi skupinou s plnotučnou sójou a kontrolou, a to ve druhé polovině snáškového cyklu (N2). V případě sójových výlisků se tedy hypotéza zamítá. Naopak pro plnotučnou extrudovanou sóju lze hypotézu potvrdit.

Vzhledem k výsledným cenám krmných směsí by se nižších nákladů na produkci vejce dosáhlo při využití diety se sójovými výlisky.

Pro další zkoumání oxidační stability vaječných žloutků by bylo pro příště vhodné, přesněji vyrovnat energetickou hodnotu krmných směsí. Případně je zde určitě prostor pro zkoumání vlivu různě vysokých rozdílů v obsahu tuku (i kyseliny linolové) a také zjištění efektu kyseliny olejové na oxidační stabilitu tuku.

8 Literatura

Agarwal R, Chase SD. 2002. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. Journal of Chromatography B **775**:121-126.

Antova GA, Gerzilov VT, Petkova ZY, Boncheva VN, Bozhichkova IN, Penkov DS, Petrov PB. 2019. Comparative analysis of nutrient content and nergy of eggs from different chicken genotypes. Journal of the Science of Food and Agriculture **13**:5890-5898.

Arent E, Holoubek J, Skřivan M, Tůmová E. 1998. Základy chovu drůbeže. ČZU. Praha.

Ayala A, Muńoz MAF. Argúelles, S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanism of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Banaszkiewicz T. 2011. Nutritional value of soybean meal. 1-20. El-Shemy HA. Soybean and Nutrition. InTech. Croatia.

Bandegan A, Kiarie E, Payne RL, Crow GH, Guenter W, Nyachoti CM. 2010. Standardized ileal amino acid digestibility in dry-extruded expelled soybean meal, extruded canola seed-pea, feather meal, and poultry by-product meal for broiler chickens. Poultry Science **89**:2626-2623.

Barriuso B, Astiasarán I, Ansorena D. 2013. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challange task. European Food Research and Technology **236**:1-15.

Bird RP, Hung SSO, Hadley M, Draper HM. 1983. Determination of malondialdehyde in biological materials by high-presure liquid chromatography. Analytical Biochemistry **128**:240-244.

Britzman DG. 2001. Sójový extrahovaný šrot: výborný zdroj proteinu do krmných směsí pro drůbež. American Soybean Association. Brusel.

Brzóska F, Koreleski J, Korol W. 2009. Possible consequences of a ban on genetically modified (GM) soybean in animal feed (in Polish). Wiadomości Zootechniczne **47**:3-10.

Cardenia V, Rodriguez-Estrada MT, Cumella F, Sardi L, Casa GD, Lercker G. 2011. Öxidative stability of pork meat lipids as related to high-oleic sunflower oil and vitamin E diet supplementation and storage conditions. Meat Science **88**:271-279.

Ceylan N, Ciftci I, Mizrak C, Kahraman Z, Efil H. 2011. Influence of different dietary oil sources on performance and fatty acids profile of egg yolk in laying hens. Journal of Animal and Feed Sciences Walailak Journal **20**:71-83.

Cighetti G, Debiasi S, Paroni R, Allevi P. 1999. Free and total malondialdehyde asSESsment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection. Analytical Biochemestry **266**:222-299.

Criste FL, Mierlita D, Simeanu D, Boisteanu PC, Pop IM, Georgescu B, Nacu G. 2018. Study of fatty acids profile and oxidative stability of egg yolk from hens fed a diet containing white lupine seeds meal. Revista de Chimie **69**:2454-2460.

Cromwel GL. 1999. Soybean Meal - The "Gold Standard". The Farmer's Pride **20**.

Cromwell GL. 2012. Soybean meal - An exceptional protein source. Soybean Meal InfoCenter.

Czauderna M, Kowalczyk J, Marounek M. 2011. The simple and sensitive measurement of malondialdehyde in selected specimens of biological origin and some feed by reversed phase high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B **879**:2251-2258.

Černý H. 2005. Anatomie domácích ptáků. Metoda. Brno

Daza A, Rey AI, Ruiz J, Lopez-Bote CJ. 2005. Effects of feeding in free-range conditions or in confinement with different dietary MUFA/PUFA rations and alpha-tocopheryl acetate, on antioxidants accumulation and oxidative stability in Iberian pigs. Meat Science **69**:151-163.

Del Rio D, Pellegrini N, Colombi B, Bianchi M, Serafini M, Torta F, Tegoni M, Musci M, Brighenti F. 2003. Rapid fluorimetric method to detect total plasma malondialdehyde with mild derivatization conditions. Clinical Chemistry **49**:690-694.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutrition, Metabolism and Cardioovascular DiseaSEŠ **15**:316-328.

Dordevič V, Dordevič J, Baltič MŽ, Laudanovič M, Teodorovič V, Boškovič M, Peurača M, Markovič R. 2016. Effect of sunflower, linseed and soybean meal in pig diet on chemical composition fatty acid profile of meat and backfat, and its oxidative stability. Acta Veterinaria-Beograd **66**:359-372.

Ensminger ME, Oldfield JE, Heineman WW. 1990. Feeds and nutrition. The Ensminger Publishing Company. Kalifornie.

ENV/JM/MONO15. 2001. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No.2, Consensus Document on Compositional Considerations for New Feeds No.2, Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients

Fasina YO, Classen HL, Garlich JD, Swaisgood HE, Clare DA. 2003. Investigating the possibility of monitoring lectin levels in commercial soybean meals intended for poultry feeding using steam-heated soybean meal as a model. Poultry Science **82**:648-656.

Grieshop CM, Fahey GR. 2001. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China and the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**:2669-2673.

Grieshop CM, Kadzere CT, Clapper GM, Flickinger EA, Bauer LL, Frazier RL, Fahey Jr GC. 2003. Chemical and Nutritional Characteristics of United States Soybeans and Soybean Meals. Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**:7684-7691.

Grobas S,Mendez J, De Blas C, Mateos GG. 1999. Influence of dietary energy, supplemental fat and linoleic acid contentration on performance of laying hens at two ages. British Poultry Science **40**:681-687.

Grotto D, Maria LS, Valentini JU, Paniz C, Garcia C. 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methological aspects for malondialdehyde quantification. Química Nova **32**:169-174.

Gutteridge JMC. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clinical Chemistry **41**:1819-1828.

Gül M, Yörük MA, Aksu T, Kaya A, Kaynar Ö. 2012. The effect of different levels of canola oil on performance, egg shell qualiy and fatty acid composition of laying hens. International Journal of Poultry Science **11**:769-776.

Halliwel B, Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. The American Journal of Clinical Nutrition **57**:715-725.

Hayat Z, Cherian G, Pasha TN, Khattak FM, Jabbar MA. 2010. Oxidative stability and lipid components of eggs from flax-fed hens: Effect of dietary antioxidants and storage. Poultry Science **89**:1285-1292.

Hernández-López SH, Rodríguez-Carpena JG, Lemus-Flores C, Grageola-Nuñez F, Estévez M. 2016. Avocado waste for finishing pigs: Impact on muscle composition and oxidative stability during chilled storage. Meat Science **116**:186-192.

Heydari A, Eslami M, Roshanfekr H, Bojarpur M, Ghorbani MR. 2009. Effeccts of different levels of processed fat and vitamin E on laying hens performance and egg yolk cholesterol. Research Journal of Biological Sciences **4**:1162-1164.

Hoan ND, Khoa MA. 2016. The effect of different levels of sesame oil on productive performance, egg yolk and blood serum lipid profile in laying hens. Open Journal of Animal Science **6**:85-93.

Chirico S. 1994. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acis tests. Methods in enzymology **33**:314-318.

Jiang ZY. 2003. Know me it pays. Proceedings of the 11th annual ASA Southeast Asian Feed Technology and Nutrition Workshop. Hanoi.

Johnson L, Smith K. 2004. Fact sheet: Soybean processing. The Soybean Meal Information Center.

Johnston SA, Gous RM. 2006. Modelling Egg Production in Lying Hens. 229-259. Gous R, Morris T, Fisher C. Mechanistic modelling in pig and poultry production. Cabi. Wallingford

Karatas F, Karatepe M, Baysar A. 2002. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry **311**:76-79.

Karr-Lilienthal LK, Bauer LL, Utterback PL, Zinn KE, Frazier RL, Parsons CM, Fahey Jr GC. 2006. Chemical Composition and Nutritional Quality of Soybean Meals Prepared by Extruder/Expeller Processing for Use in Poultry Diets. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**:8108-8114.

Kim HJ, Lee HK, Yang TS, Kang HK, Kil DY. 2019. Effect of different sources and inclusion levels of dietary fat on productive performance and egg quality in lying hens raised under hot enviromental conditions. Asian-Australas Journal of Animal Sciences **32**1407-1413.

King EJ, Hugo A, de Witt FH, van der Merwe HJ, Fair MD. 2012. Effect of dietary fat source on fatty acid profile and lipid oxidation of eggs. South African Journal of Animal Science **42**:503-506.

Kodeš A, Výmola J. 2003. Základy moderní výživy drůbeže. Tekro. Praha.

Krejcar P. 2011. Sója do všech oblastí. Zemědělec **19**:20.

Kříž L. 1997. Základy výživy a technika krmení drůbeže. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR v Praze. Praha.

Liener IE. 2000. Non-Nutritive Factors and Bioactive Compounds in Soy: Soy in Animal nutrition Symposium. Fed. An. Sci. Societies. Savoy.

Lohmann. 2010. Management guide for Lohmann Brown-Classic. Lohmann Tierzucht GmbH. Germany.

Lund MN, Hviid MS, Claudi-Magnussen C, Skibsted LH. 2008. Effects of dietary soybean oil on lipid and protein oxidation in pork patties during chill storage. Meat Science **79**:727-733.

Maboudou P, Mathieu D, Bachelet H, Wiart JF, Lhermitte M. 2002. Detection of oxidative stress. Interest of GC-MS for malondialdehyde and formaldehyde monitoring. Biomedical Chromatography **16**:199-202.

Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. Mutation Research **424**:83-95.

Martinez MP, Kannan K. 2018. Simultaneous analysis of seven biomarkers of oxidative damage to lipids, proteins, and DNA in urine. Enviromental Science a Technology **52**:6647-6655.

Mervart V. 2005. Zpracování sóji. 70-72. Švachula V, Jaroslav Š, Přemysl Š. Perspektivy sóji v ČR. Katedra rostlinné výroby. Praha.

Muangkeow N. 2011. Effect of feeding soybean and palm blended oil on laying performance and egg quality. Walailak Journal of Science and Technology **8**:51-61.

Nahashon SN, Kilonzo-Nthenge AK. 2011. Advances in Soybean and Soybean By-Producks in Monogastric Nutrition and Health. 125-156. El-Shemy HA. Soybean and Nutrition. InTech. Croatia.

Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. 2003. Malondialdehyde, a produkt of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. The journal of biological chemistry **278**:31426-31433.

Nobakht A, Safamehr A, Sozany S, Galandari I, Taghavi E, Ghaboli A. 2011. Comparison of effects of using different levels of animal and vegetable fats and their blends on performance of laying hens. The Journal of Applied Polutry Research **10**:1433-1437.

Nutrition of the European federation of branches of the World's poultry Science Association. 1989. European Table of Energy Values for Poultry Feedstuffs. Beekbergen.

O´Quinn PR, Knabe DA, Gregg EJ, Lusas EW. 1997. Nutritional value for swine of soybean meal produced by isopropyl alcohol extraction. Journa of Animal Science **75**:714-719

.

Oil World, 2015. Oil World Annual 2015. ISTA Mielke GmbH, Hamburg.

Okabe Y, Watanabe A, Shingu H, Kushibiki S, Hodate K, Ishida M, Ikeda S, Takeda T. 2002. Effects of alpha-tocopherol level in raw venision on lipid oxidation and volatiles during storage. Meat Science **62**:457-462.

Okrouhlá M, Stupka R, Čítek J, Lebedová N, Zadinová K. 2018. Effect of duration of dietry rapeseed and soybean oil feeding on physical characteristics, fatty acid profile, and oxidative stability of pig backfat. Animals **8**:1-11.

Parkhurst CR, Mountney GJ. 1988. Poultry Meat and Egg Production. AVI Book. New York.

Parsons CM, Zhang Y, Araba M. 2000. Nutritional Evaluation of Soybean Meals Varying in Oligosaccharide Concent. Poultry Science **79**:1127-1131.

Pérez-Bonilla A, Frikha M, Mirzaie S, García J, Mateos GG. 2011. Effects of the main cereal and type of fat of the diet on productive performance and egg quality of brown-egg laying hens from 22 to 54 weeks of age. Poutry Science **90**:2801-2810.

Pérez-Bonilla A, Jabbour C, Frikha M, Mirzaie S, García J, Mateos GG. 2012(a). Effect of crude protein and fat content of diet on producitve performance and egg quality traits of brown egg-laying hens with different initial body weight. Poultry Science **91**:1400-1405.

Pérez-Bonilla A, Novoa S, García J, Mohiti-Asli M, Frikha M, Mateos GG. 2012(b). Effects of energy concentration of the diet on productive performance and egg quality of brown egg laying hens differinf of initial body weight. Poultry Science **91**:3156-3166.

Pettigrew JE, Soltwede KT, Miguel JC, Palacios MF. 2008. Fact sheet - Soybean Use - Swine. Soybean Meal Information Center.

Pop F, Giurgiulescu L, Dumuta A, Vosgan Z. 2013. Assessment of lipolytic and oxidative changes in fish oil stored under refrigeneration and freezing. Revista de chimie **64**:1372-1376.

Prombergerová I. 2005(a). Dospívání drůbeže a snáška. Chovatel-rádce **6**:9-10.

Prombergerová I. 2005(b). Snáška. Chovatel-rádce **6**:6-8.

Prombergerová I. 2011(a). Dospívání drůbeže a začátek snášky. Chovatel **50**:18-19.

Prombergerová I. 2011(b). Tvorba vejce a snáška. Chovatel **50**:18-20.

Ravindran V, Cabahug G, Ravindran G, Selle PH, Bryden WL. 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolizable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. British poultry science **41**193-200.

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

Salgado P, Freire JPB, Mourato M, Cabral F, Toullec R, Lalles JP. 2002. Comparative effects of different legume protein sources on weaned piglets: nutrient digestibility , intestinal morphology and digestive enzymes. Livestock Production Science **74**:191-202.

Sim AS, Salonikas Ch, Naidoo D, Wilcken DEL. 2003. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. Journal of Chromatography B **875**:337-344.

Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. 2000. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. Diabetologia **43**:550-557.

Slugeň D. 1997. Nutraceutika: Pšenice a sója. SSFS Bratislava. Bratislava.

Stalikas CD, Konidari CN. 2001. Analysis of malondialdehyde in biological matrices by capillary gas chromatography with electron-capture detection and mass spectrometry. Analytical Biochemistry **290**:108-115.

Steghens JP, van Kappel AL, Denis I, Collombel C. 2001. Diaminonaphthalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. Free Radical Biology and Medicine **31**:242-249.

Svobodová L. 2012. Stanovení malondialdehydu v seminální plazmě metodou kapalinové chromatografie [Diplomová práce]. Univerzita Pardubice, Pardubice.

Šťastník O, Karásek F, Štenclová H, Mrkvicová E, Doležal P, Prochta V. 2016. Plnotučná sója ve výživě zvířat. Krmivářství. **20**:22-23.

Tamer L, Sucu N, Polat G, Ercan B, Aytacoglu B, Yücebilgic G, Ünlü A, Dikmengil M, Atik U. 2002. Decrease serum total antioxidant status and erythrocyte-reduced glutathione levels are associated with increased serum malondialdehyde in atherosclerotic patients. Archives of Medical Research **33**:257-260.

Templar J, Kon SP, Milligan TP, Newman DJ, Raftery MJ. 1999. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. Nephrology Dialysis Transplantation **14**:946-951.

Uchida K. 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseaSEŠ. Free Radical Biology and Medicine **28**:1685-1696.

Van Eys JE, Offner A, Bach A. 2004. Chemical Analysis. Manual of Quality Analysis for Soybean Products in the Feed Industry. American Soybean Association.

VanderVeen LA, Hashim MF, Shyr Y, Marnet, LAJ. 2003. Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. Proceedings of the National Academy of Sciences **100**:14247-14252.

Vavrečka J, Mareš P, Zeman L. 2005. Sója pro prasata ve výkrmu. 63-66. Švachula V, Jaroslav Š, Přemysl Š. Perspektivy sóji v ČR. Katedra rostlinné výroby. Praha.

Voitkun V, Zhitkovich A. 1999. Anaysis of DNA - protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. Mutation Research **424**:97-106.

Wang Q, Jin G, Wang N, Guo X, Jin Y, Ma M. 2017. Lipolysis and oxidation of lipids during egg storage at different temperatures. Czech Journal of Food Science **35**:229-235.

Weismann,D, Binder CJ. 2012. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1818**:2465-2475.

Winiarska-Mieczan A. 2007. Bowman-Birk trypsyn inhibitors: their structure and value in human and animal feeding (in Polish). Medycyna Weterynaryjna **63**:276-281.

Yang A, Lanari MC, Brewster MJ, Tume RK. 2002. Lipid stability and meat colour of beef from pasture and grain-fed cattle with or without vitamin E suplement. Meat Science **60**:41-50.

Yoneyama Y, Sawa R, Suzuki S, Doi D, Yoneyama K, Otsubo Y, Araki T. 2002. Relationship between plasma malondialdehyde levels and adenosine deaminase activites in preeclampsia. Clinica Chimica Acta **322**169-173.

Yuan K, Wu G, Bryant MM, Roland DA. 2009. Effect of dietary fat and protein on performance, egg composition, egg solids, and egg quality of Hy-line W-36 hens during phase 1. Journal of Poultry Science **46**:322-327.

Yuan N, Wang JP, Ding XM, Bai SP, Zeng QF, Su ZW, Xuan Y, Peng HW, Fraley GS, Zhang KY. 2019. Effects of supplementation with different rapeseed oil sources and levels on production performance, egg quality, and serum parameters in laying hens. Poultry Science **98**: 1697-1705.

Zelenka J, Heger J, Zeman L. 2007. Doporučený obsah živin v krmných směsích a výživná hodnota krmiv pro drůbež. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno.

Zelenka J. 2014. Výživa a krmení drůbeže. Agriprint. Olomouc.

Zeman L, Vavrečka J, Sikora M, Mareš P. 2005. Termická a hydrotermická úprava sójových bobů. 67-69. Švachula V, Jaroslav Š, Přemysl Š. Perspektivy sóji v ČR. Katedra rostlinné výroby. Praha.

9 Samostatné přílohy

Tabulka 5: Krmné směsi N1 a N2 se sójovými výlisky

SUROVINY	**KČ/KG**		**N1**	**KČ**	**N2**	**KČ**	**ŽIVINY V 1 KG**		**N1**	**N2**
Pšenice 13, 13	3	%	**73,130**	2,20	**74,740**	2,24	**Me_d**	MJ	11,200	11,078
Výlisky sójové	12	%	**14,000**	1,68	**11,500**	1,38	**NL**	g	155,384	157,469
Vojtěšk. m. 18	2,3	%	**3,000**	0,07	**4,000**	0,09	**Vláknina**	g	33,586	31,729
L-Lysin.HCl 98	46	%	**0,140**	0,06	**0,100**	0,05	**Lysin**	g	7,803	7,429
L-threonin 98	120	%	**0,030**	0,04	**-**	-	**Methionin**	g	3,388	3,572
DL-methionin 99	120	%	**0,040**	0,05	**0,060**	0,07	**Met+Cys**	g	6,288	8,455
Vápenec	4,5	%	**7,800**	0,35	**7,800**	0,35	**Threonin**	g	5,450	6,621
Sůl	2,5	%	**0,350**	0,01	**0,250**	0,01	**Tryptofan**	g	-	1,866
MCP	16	%	**1,080**	0,17	**0,940**	0,15	**Arginin**	g	-	8,120
Uhličitan sodný	6	%	**-**	-	**0,110**	0,01	**k. linolová**	g	11,403	10,664
Amv SK-SUPER	120	%	**0,500**	0,60	**0,500**	0,60	**Vápník**	g	32,186	32,023
							P nefytátový	g	3,640	3,319
							Sodík	g	1,609	1,524
CELKEM	Kč/kg			5,23		4,95	**Chlor**	g	-	2,094
							Mangan	mg	115,312	-
							Zinek	mg	82,565	-

Tabulka 6: Krmné směsi N1 a N2 s plnotučnou sójou

SUROVINY	KČ/KG		N1	KČ	N2	KČ	ŽIVINY V 1 KG		N1	N2
Pšenice 13, 13	3	%	**74,810**	2,24	**74,930**	2,25	**Me_d**	MJ	11,497	11,597
Sója extrudovaná	13,5	%	**12,000**	1,62	**11,200**	1,51	**NL**	g	143,823	149,460
Vojtěšk. m. 18	2,3	%	**3,000**	0,07	**4,000**	0,10	**Vláknina**	g	34,268	28,856
L-Lysin.HCl 98	46	%	**0,250**	0,12	**0,150**	0,07	**Lysin**	g	7,804	7,404
L-threonin 98	120	%	**0,100**	0,12	**-**	-	**Methionin**	g	3,645	3,221
DL-methionin 99	120	%	**0,080**	0,10	**0,030**	0,04	**Met+Cys**	g	6,339	7,978
Vápenec	4,5	%	**7,900**	0,36	**7,900**	0,36	**Threonin**	g	5,533	6,288
Sůl	2,5	%	**0,360**	0,01	**0,250**	0,01	**Tryptofan**	g	-	1,819
MCP	16	%	**1,000**	0,16	**0,920**	0,15	**Arginin**	g	-	7,594
Uhličitan sodný	6	%	**-**	-	**0,120**	0,01	**k. linolová**	g	18,663	17,895
Amv SK-SUPER	120	%	**0,500**	0,60	**0,500**	0,60	**Vápník**	g	32,347	32,321
							P nefytátový	g	3,644	3,450
							Sodík	g	1,615	1,521
CELKEM	Kč/kg			5,40		5,10	**Chlor**	g	-	2,102
							Mangan	mg	115,776	-
							Zinek	mg	81,346	-

Tabulka 7: Krmná směs N1 se sójovým extrahovaným šrotem

SUROVINY	KČ/KG		N1	KČ	N2	KČ	ŽIVINY V 1 KG		N1	N2
Pšenice 13, 13	3	%	**70,490**	2,11	**74,510**	2,24	**Me_d**	MJ	11,443	11,025
Extrahovaný sójový šrot 46	9	%	**14,000**	1,26	**11,000**	0,99	**NL**	g	156,600	162,235
Vojtěšk. m. 18	2,3	%	**3,000**	0,07	**4,000**	0,92	**Vláknina**	g	33,848	26,283
Olej řepkový	24	%	**2,510**	0,60	-	-	**Lysin**	g	8,278	7,442
Olej sójový	17	%	-	-	**0,750**	1,28	**Methionin**	g	3,618	3,266
L-Lysin.HCl 98	46	%	**0,180**	0,08	**0,170**	0,78	**Met+Cys**	g	6,552	6,423
L-threonin 98	120	%	**0,050**	0,06	-	-	**Threonin**	g	5,684	5,046
DL-methionin 99	120	%	**0,060**	0,07	**0,020**	0,24	**Tryptofan**	g	-	1,851
Vápenec	4,5	%	**7,800**	0,35	**7,800**	0,35	**Arginin**	g	-	8,019
Sůl	2,5	%	**0,350**	0,01	**0,270**	0,01	**k. linolová**	g	10,235	11,746
MCP	16	%	**1,060**	0,17	**0,890**	0,14	**Vápník**	g	32,108	32,675
Uhličitan sodný	6	%	-	-	**0,090**	0,01	**P nefytátový**	g	3,606	3,312
Amv SK-SUPER	120	%	**0,500**	0,60	**0,500**	0,60	**Sodík**	g	1,604	1,507
							Chlor	g	-	2,197
CELKEM	Kč/kg			5,38		7,56	**Mangan**	mg	114,887	-
							Zinek	mg	81,186	-

Tabulka 8: Složení premixu Amv SK-SUPER

SLOŽKA	JEDNOTKA OBSAHU	OBSAH
Pšeničká krmná mouka	g	299,500
Butylhydroxyanisol	mg	200,000
Butylhydroxytoluen	mg	1500,000
Ethoxychin	mg	1111,100
Vitamin B2	mg	1000,000
Vitamin B12	mg	3,000
Niacinamid	mg	5000,000
Kyselina listová	mg	100,000
Cholekalciferol, vitamin D3	IU	600000,000
Vitamin A	IU	2000000,000
Vitamin E	IU	6000,000
Vitamin K1, K3	mg	400,000
Vitamin B1	mg	400,000
Vitamin B6	mg	600,000
D-pantothenan vápenatý	mg	1600,000
Biotin	mg	15,000
Cholinchlorid	mg	50000,000
Bezvodý betain	mg	20000,000
Jodičnan vápenatý bezvodý	mg	200,000
Potahovaný granulovaný bis(uhličitan kobaltnatý	mg	60,000
Síran měďnatý pentahydrát	mg	1200,000
Oxid manganatý	mg	14000,000
Oxid zinečnatý	mg	40,000
Seleničitan sodný	g	60,000
L-Lysin	g	140,000
DL-methionin	g	140,000
Sušina	g	950,000
MET+CYS	g	140,000

Tabulka 9: Shrnutí základních charakteristik u vybraných parametrů pro N1 směsi u třech sledovaných ukazatelů užitkovosti mezi skupinami.

[a] snáška během 14 dnů; x̄ aritmetický průměr; σ směrodatná odchylka; ± směrodatná chyba

N1	SLEDOVANÉ KRITÉRIUM											
	Spotřeba na klec (g)				Spotřeba KD na ks (g)				Snáška za období na klec[a] (ks)			
	x̄	σ	min	max	x̄	σ	min	max	x̄	σ	min	max
PS	1396,9 ± 19,28	115,7	1063,2	1703,6	139,7 ± 2,31	11,3	117,3	170,4	116,8 ± 1,56	7,6	100,0	132,0
SEŠ	1400,3 ± 20,47	100,3	1063,2	1558,2	140,0 ± 2,05	10,0	106,3	155,8	118,9 ± 1,12	5,5	111,0	129,0
SV	1397,0 ± 20,10	98,5	1243,9	1589,3	141,3 ± 2,10	10,3	124,4	158,9	117,8 ± 1,60	7,8	109,0	132,0

Tabulka 10: Shrnutí základních charakteristik u vybraných parametrů pro N1 směsi mezi jednotlivými skupinami.

x̄ aritmetický průměr; σ směrodatná odchylka; ± směrodatná chyba

N1	SLEDOVANÉ KRITÉRIUM															
	Spotřeba na vejce (g)				Intenzita snášky (%)				HMV (g)				MDA (mg/kg)			
	x̄	σ	min	max	x̄	σ	min	max	x̄	σ	min	max	x̄	σ	min	max
PS	168,2 ± 3,70	18,5	132,4	203,8	83,5 ± 1,11	5,5	71,4	94,3	68,3 ± 0,48	6,0	53,9	83,6	0,468 ± 0,0	0,100	0,400	0,600
SEŠ	165,3 ± 1,20	5,5	111,0	129,0	84,9 ± 0,80	3,9	79,3	92,1	67,2 ± 0,50	6,3	51,3	87,6	0,414 ± 0,02	0,058	0,336	0,572
SV	166,4 ± 1,50	7,8	109,0	132,0	85,0 ± 1,06	5,2	77,9	94,3	66,7 ± 0,50	5,3	50,9	82,5	0,459 ± 0,02	0,052	0,382	0,556

Tabulka 11: Shrnutí základních charakteristik u vybraných parametrů pro N1 směsi u třech sledovaných ukazatelů užitkovosti mezi skupinami.

[a] snáška během 14 dnů; x̄ aritmetický průměr; σ směrodatná odchylka; ± směrodatná chyba

N2	SLEDOVANÉ KRITÉRIUM											
	Spotřeba na klec (g)				Spotřeba KD na ks (g)				Snáška za období na klec[a] (ks)			
	x̄	σ	min	max	x̄	σ	min	max	x̄	σ	min	max
PS	1331,7 ± 21,47	135,8	930,4	1511,4	135,0 ± 2,22	14,0	93,0	151,9	100,6 ± 1,95	12,3	70,0	120,0
SEŠ	1409,2 ± 20,03	126,7	892,1	1557,9	142,8 ± 2,06	13,0	89,2	155,87	94,3 ± 1,87	11,8	67,0	114,0
SV	1339,4 ± 25,94	164,1	870,0	1700,4	139,1 ± 2,65	16,77	91,9	170,0	97,5 ± 2,19	13,8	57,0	125,0

Tabulka 12: Shrnutí základních charakteristik u vybraných parametrů pro N1 směsi mezi jednotlivými skupinami.

$\bar{x}$ aritmetický průměr; σ směrodatná odchylka; ± směrodatná chyba

N2	**SLEDOVANÉ KRITÉRIUM**															
	Spotřeba na vejce (g)				**Intenzita snášky (%)**				**HMV (g)**				**MDA (mg/kg)**			
	$\bar{x}$	**σ**	**min**	**max**	**$\bar{x}$**	**σ**	**min**	**max**	**$\bar{x}$**	**σ**	**min**	**max**	**$\bar{x}$**	**σ**	**min**	**max**
PS	189,6 ± 4,60	29,1	120,6	274,0	72,7 ± 1,31	8,3	50,0	85,7	73,0 ± 0,50	5,8	57,9	91,4	0,482 ± 0,01	0,054	0,402	0,594
SEŠ	214,9 ± 4,34	27,5	143,6	280,0	68,0 ± 1,23	7,8	53,2	84,0	72,0 ± 0,49	5,6	59,1	86,7	0,428 ± 0,01	0,047	0,361	0,540
SV	197,9 ± 5,14	32,5	123,7	299,4	72,1 ± 1,35	8,5	45,2	89,3	69,8 ± 0,44	5,2	59,2	83,6	0,456 ± 0,01	0,044	0,375	0,559

Tabulka 13: Statistické vyhodnocení rozdílu pro spotřebu krmiva na klec; Tuckeyův HSD test; PČ = 16904; α= 0,05

		PS N1	PS N2	SEŠ N1	SEŠ N2	SV N1	SV N2
PS	**N1**		0,182460	0,999999	0,590930	1,000000	0,093419
PS	**N2**	0,182460		0,146258	0,962385	0,181768	0,999473
SEŠ	**N1**	0,999999	0,146258		0,523993	0,999999	0,072100
SEŠ	**N2**	0,590930	0,962385	0,523993		0,589747	0,855954
SV	**N1**	1,000000	0,181768	0,999999	0,589747		0,093002
SV	**N2**	0,093419	0,999473	0,072100	0,855954	0,093002	

Tabulka 14: Statistické vyhodnocení rozdílu pro spotřebu krmiva na kus a krmný den; Tuckeyův HSD test; PČ=177,13; α= 0,05

		PS N1	PS N2	SEŠ N1	SEŠ N2	SV N1	SV N2
PS	**N1**		0,602385	0,999999	0,984384	0,998566	0,973396
PS	**N2**	0,602385		0,537004	0,897972	0,314137	0,931014
SEŠ	**N1**	0,999999	0,537004		0,971604	0,999557	0,955344
SEŠ	**N2**	0,984384	0,897972	0,971604		0,867452	0,999999
SV	**N1**	0,998566	0,314137	0,999557	0,867452		0,827231
SV	**N2**	0,973396	0,931014	0,955344	0,999999	0,827231	

Tabulka 15: Statistické vyhodnocení rozdílu pro snáška za období na klec; Tuckeyův HSD test; PČ=119,56; α= 0,05

Statisticky významné rozdíly jsou zobrazeny červeně.

		PS N1	PS N2	SEŠ N1	SEŠ N2	SV N1	SV N2
PS	**N1**		0,000020	0,986182	0,000020	0,999724	0,000020
PS	**N2**	0,000020		0,000020	0,895878	0,000020	0,999997
SEŠ	**N1**	0,986182	0,000020		0,000020	0,999105	0,000020
SEŠ	**N2**	0,000020	0,895878	0,000020		0,000020	0,933073
SV	**N1**	0,999724	0,000020	0,999105	0,000020		0,000020
SV	**N2**	0,000020	0,999997	0,000020	0,933073	0,000020	

Tabulka 16: Statistické vyhodnocení rozdílu pro spotřebu krmiva na vejce; Tuckeyův HSD test; PČ=610,89; α= 0,05

Statisticky významné rozdíly jsou zobrazeny červeně.

		PS	PS	SEŠ	SEŠ	SV	SV
		N1	N2	N1	N2	N1	N2
PS	N1		0,009919	0,998774	0,000067	0,999870	0,011838
PS	N2	0,009919		0,001957	0,679125	0,003643	1,000000
SEŠ	N1	0,998774	0,001957		0,000025	0,999991	0,002395
SEŠ	N2	0,000067	0,679125	0,000025		0,000032	0,640254
SV	N1	0,999870	0,003643	0,999991	0,000032		0,004434
SV	N2	0,011838	1,000000	0,002395	0,640254	0,004434	

Tabulka 17: Statistické vyhodnocení rozdílu pro intenzitu snášky; Tuckeyův HSD test; PČ=51,254; α= 0,05

Statisticky významné rozdíly jsou zobrazeny červeně.

		PS	PS	SEŠ	SEŠ	SV	SV
		N1	N2	N1	N2	N1	N2
PS	N1		0,000020	0,979577	0,000020	0,975333	0,000021
PS	N2	0,000020		0,000020	0,925151	0,000020	0,897649
SEŠ	N1	0,979577	0,000020		0,000020	1,000000	0,000020
SEŠ	N2	0,000020	0,925151	0,000020		0,000020	0,321577
SV	N1	0,975333	0,000020	1,000000	0,000020		0,000020
SV	N2	0,000021	0,897649	0,000020	0,321577	0,000020	

Tabulka 18: Statistické vyhodnocení rozdílu pro průměrnou hmotnost vajec (HMV); Tuckeyův HSD test; PČ=32,721; α= 0,05

Statisticky významné rozdíly jsou zobrazeny červeně.

		PS	PS	SEŠ	SEŠ	SV	SV
		N1	N2	N1	N2	N1	N2
PS	N1		0,000021	0,998937	0,000020	0,963255	0,004075
PS	N2	0,000021		0,000028	0,983335	0,000020	0,534262
SEŠ	N1	0,998937	0,000028		0,000020	0,834920	0,013974
SEŠ	N2	0,000020	0,983335	0,000020		0,000020	0,167824
SV	N1	0,963255	0,000020	0,834920	0,000020		0,000207
SV	N2	0,004075	0,534262	0,013974	0,167824	0,000207	

Tabulka 19: Statistické vyhodnocení rozdílu pro koncentraci MDA; Tuckeyův HSD test; PČ=,00281; α= 0,05

Statisticky významné rozdíly jsou zobrazeny červeně.

		PS	PS	SEŠ	SEŠ	SV	SV
		N1	N2	N1	N2	N1	N2
PS	**N1**		0,983053	0,162088	0,341796	0,998205	0,976698
PS	**N2**	0,983053		0,011585	**0,022357**	0,849466	0,541588
SEŠ	**N1**	0,162088	0,011585		0,977910	0,356331	0,346751
SEŠ	**N2**	0,341796	**0,022357**	0,977910		0,644726	0,653893
SV	**N1**	0,998205	0,849466	0,356331	0,644726		0,999868
SV	**N2**	0,976698	0,541588	0,346751	0,653893	0,999868	