

6. Hlivak P., Ondraška J., Ferenčík M., Ebringer L., Jahnová E., Mikeš Z. (2005): One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. *Brat.Lek.Listy*,106(2):67-72
7. Hlivák P., Jahnová E., Ondraška J., Ferenčík M., Ebringer L., Mikeš Z. (2005): Long-term (56-week) oral administration of probiotic *Enterococcus faecium* M-74 decreases the expression of s ICAM-1 and monocyte CD54 and increases that of lymphocyte CD49d in humans. *Brat.Lek.Listy*,106(4-5):175-
8. Lund B., Adamsson I., Edlund C. (2002): Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *Int.J.Food Microbiol.*,25,77(1-2):109-15
9. Nielsen O.H., Jorgensen S., Pedersen K., Justesen T. (1994): Microbiological evaluation of jejunal aspirates and faecal samples after oral administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* , 76(5):469-74
10. Richelsen B., Kristensen K., Pedersen S.B. (1996): Long-term (6month) effect of a new fermented milk product on the level of plasma lipoproteins -a placebo- controlled and double blind study. *Eur.J.Clin.Nutr.*, 50(12):811-5
11. Rossi E.A., Vendramini R.C., Carlos I.Z., de Oliveira M.G., de Valdez G.F. (2003): Effect of a new fermented soy milk on serum lipid levels in normocholesterolemic adult men. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Mar,53(1):47-51

Přijato do tisku 10. 10. 2009

Lektorováno 27. 10. 2009

VLIV SUPLEMENTACE PROBIOTICKÝCH KMENŮ KVASINEK VE VÝŽIVĚ DOJNIC NA KVALITU MLÉKA

Seydlová R., Snášelová J.

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Impact of feed supplementation of yeast probiotic gene on the quality of cow milk

Abstrakt

Moderní systémy výživy dojníc se progresivně změnily z krmných dávek založených na objemné píce fermentovaná glycidová krmiva, která respektují nárůst mléčné produkce u vysokoprodukčních dojníc. Jsou zkrmovány siláže s vysokým obsahem kyselin, nízkým obsahem vlákniny a vysokými dávkami jadrných koncentrátů (Peyrau and Apper-Bossard, 2006). V souvislosti s tím se mohou objevit zažívací poruchy jako je subakutní bachorová acidóza jako důsledek akumulace mastných kyselin a kyseliny mléčné v bachoru. Aplikace nových krmných aditiv, probiotických kmenů kvasinek, má pozitivní vliv na stabilizaci bachorového pH, prevenci bachorové acidózy a zvýšení využitelnosti krmné dávky. Kyselost prostředí v bachoru sehrává důležitou roli v regulaci mikrobiologických zástupců, zejména pak celulolytických, které pozitivně ovlivňují utilizaci vlákniny.

Abstract

Modern feeding strategies have changed from primary forage-based to progressively more readily fermentable carbohydrate feedstuffs in dairy rations to meet the increasing milk production of high-producing animals. These practices favor the use of silages with a high acid content, low fiber diets with reduced particle size, and high levels of concentrates (Peyrau and Apper-Bossard, 2006). As a result, they can lead to appearance of digestive disorders such as subacute ruminal acidosis in dairy cattle if appropriate precautions are not taken.

Excessive intake of carbohydrate usually implies a temporal decrease in ruminal pH because of accumulation of VFA (volatile fatty acid) and lactic acid in rumen.

Utilization of new feed additives such as the probiotic genes of yeast has a positive effect on stabilization of ruminal pH, prevention ruminal acidosis, improving digestibility of the diet.

Ruminal pH plays an important role in regulating the microbial ecosystem especially for sensitive microorganisms such as cellulolytic bacteria. Live yeast is allowing better fiber digestion.

Kvasinky ve výživě dojníc a kvalita mléka

Bachor přežvýkavců je jedním z nejdůležitějších orgánů z hlediska zpracování objemných krmiv. Tento proces zde probíhá ve dvou liniích. V prvním se účastní sekrety gastrointestinálního traktu (kyselina chlorovodíková, pankreatické enzymy), ve druhém fermentativním kroku působí na rozklad mikroorganismy zažívacího traktu. Ty jsou schopny rozložit živiny na nejjednodušší komponenty, které teprve mohou být absorbovány a využívány. Mezi přežvýkavcem a bachorovou mikrobiální populací jsou klasické symbiotické vztahy.

Hodnota kyselosti (pH) v bachoru je důležitým regulačním faktorem celého mikrobiálního ekosystému, který ovlivňuje i koncentraci celulolytických bakterií. Chaucheyras-Durand and Fonty (2002) pokročili dále v měření tohoto fyzikálně chemického parametru a místo pH začali měřit redox potenciál (Eh).

Moderní principy koncepce krmných dávek pro vysoko-produkční dojnice zaznamenaly významné změny během relativně krátkého období. Komponenty krmných dávek založené zejména na objemných krmivech se změnily ve prospěch respektování požadavku dojníc s vysokými nádoji a významně se posunuly ve prospěch fermentovaných glycidových krmiv a koncentrátů. Jsou tedy zkrmovány siláže a senáže s vysokým obsahem kyselin, nízkým obsahem vlákniny spolu s vysokými dávkami jadra (Peyraud and Apper-Bossard, 2006).

Tyto faktory mohou vést ke vzniku celé řady metabolických onemocnění, mezi něž patří i subakutní bachorová acidóza. Ta sebou nese celou řadu negativních průvodních jevů od sníženého bachorového pH, které nevytváří optimální podmínky pro rovnoměrnou skladbu mikroflóry

(celulolytické bakterie) až po snížené obsahy tuku v mléce a horší využitelnost krmiv. Aspekty se týkají nejenom dosahované užitkovosti, ale i zdravotního stavu dojnic a zejména pak ekonomiky výroby.

Bachor přežvýkavců můžeme považovat za základ zdraví dojnice a jeho funkce je úzce propojena s dosahovanou užitkovostí a vyrovnaností všech fyziologických funkcí. Zde je krmivo přeměňováno na energii v podobě těkavých mastných kyselin a mikrobiální proteiny mikrobiálním společenstvím. Jednoznačně tedy existuje přímá vazba mezi potenciálem bachorových mikroorganismů a jejich působením na rozklad komponentů krmné dávky na navazující stavební produkty. Bachor je základním stavebním kamenem zdraví a odpovídající užitkovosti.

Na trhu s krmnými doplňky pro přežvýkavce se objevila probiotika, direct fed microbials. Probiotika jsou živé v přírodě se vyskytující suplementy (Yoon and Stern, 1999), které zahrnují zástupce bakterií, hub a plísň. Kvasinky a kvasinkové kultury jsou už zkrmovány dojnícím více než 60 let s rozdílnými výsledky (Schingoethe et al., 2004).

Probiotika jsou definována jako mikroorganismy, které jsou schopny stimulovat růst ostatních mikroorganismů v protikladu k antibiotikům, která růst inhibují. Komplex bachorové mikrobiální populace je zodpovědný za 60-70% utilizace komponentů krmné dávky, a proto aplikace probiotik má významně vyšší benefit právě u přežvýkavců v porovnání s monogastrickými zvířaty. Všeobecně je známo, že počet bakterií narůstá v bachoru v souvislosti s podáváním kvasinkových probiotik dojnícím. Doreau a Jouany (1998) zjistili, že koncentrace jmenovitě protozoí byla v bachoru při zkrmování kvasinkových kultur o 30-75% vyšší v porovnání s kontrolou. Kvasinkové kmeny jsou přítomny ve formě kvasinkových kultur nebo kvasinkových extraktů.

Podávání kvasinkových kultur je nejučinnější, když bachorové funkce nejsou optimální, zejména pak když krmná dávka je buď zatížena vysokými dávkami koncentrátů se snadno fermentovatelnými zdroji energie a nebo na druhé straně krmná dávka je nutričně nedostačující, což znamená, že má nevyvážený obsah snadno rozpustných cukrů a energetických zdrojů a obsahuje vysoké % vlákniny. Zejména v ekologických chovech vzhledem k požadavkům není lehké vytvořit živinově vyrovnanou krmnou dávku a právě tyto chovy by se měly stát cílovou skupinou, kde by se měla probiotika jako přirozený zdroj mikroorganismů aplikovat a tím zlepšovat welfare dojnic, využitelnost krmiv a nutriční složky mléka.

Živý specifický kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* vyselektovaný pro použití u přežvýkavců byl prověřen a otestován mnoha vědeckými testacemi a dokonce jeho vliv na stravitelnost vlákniny byl nedávno potvrzen i Úřadem pro kontrolu potravin a léků v USA (US Food and Drug Administration, FDA). Centrum veterinární medicíny FDA udělilo povolení charakterizovat mechanismus účinku *Saccharomyces cerevisiae* (SC I-1077) následovně: pozitivně působí při udržování populace celulolytických bakterií v bachoru přežvýkavců krmných více než z 50% jadrnými

koncentráty. Tato charakteristika se týká většiny krmných dávek určených pro intenzivní chovy vysokoprodukčních dojnic, kde krmné dávky obsahují objemné krmivo i koncentrát a vykazují 30-40% snadno degradovatelných cukrů. SC I-1077 reprezentuje přírodní řešení optimalizace krmiva vedoucí ke zvýšené dostupnosti energie krmiva. Používáním SC I-1077 v krmivu pro přežvýkavce se zvyšuje stravitelnost neutrální vlákniny.

Zkrmováním kvasinkových kultur se zvyšuje využitelnost a příjem sušiny krmné dávky (Miller et al., 2002). Lyons dokonce předpokládá schopnost kvasinek produkovat kyselinu glutamovou, která může zchutnit krmiva podávaná přežvýkavcům.

Kvasinky jsou aerobní mikroorganismy, a pokud jsou podávány v krmné dávce, spotřebovávají v bachoru kyslík, vytvářejí adenosintrifosfát ATP jako zdroj energie (Jouany, 2001). Po vyčerpání jeho zásob odumírají, a proto je nutné zásobovat krmnou dávku minimálně 2 krát denně přísunem nových kvasinek, aby byla zachována posloupnost mikrobiologických a chemických procesů a teprve tak byla docílena signifikantní stabilizace bachorového pH (Marden et al., 2008).

Kvasinky adherují k částicám škrobu a tím je de facto chráně před působením enzymů, které působí jejich rozpad. Čím menší množství glukózy je dostupné, tím roste méně fermentativních bakterií a vzniká méně kyselin, které mohou destabilizovat rovnovážný stav kyselin v bachoru a iniciovat předpoklad pro nežádoucí vznik acidózy, metabolického onemocnění dojnice. Kvasinky stimulují metabolismus laktátu, dokonce méně laktátu se tvoří i v bachoru, snižuje se jeho kyselost vyjádřená hodnotou pH. Nocek et al. (2000) tak zaznamenal snížené nebezpečí vzniku acidózy u dojnic, které dostávaly kombinaci kvasinek a laktát produkujících bakterií. Snížení pH bachoru má na druhé straně i pozitivní vliv na rozvoj celulolytických bakterií, které se významně podílejí na rozpadu vlákniny podávaných objemných krmiv. Beauchemin et al. (2006) zdůraznili, že zvýšená utilizace vlákniny v bachoru je jedním z nejstálějších atributů zkrmování kvasinkových kultur.

Bylo potvrzeno opakovanými studiemi, že kvasinkové kultury poskytují mikroflóře bachoru i rozpustné růstové faktory jako jsou organické kyseliny, vitamíny skupiny B (thiamin) a aminokyseliny, které se podílejí na stimulaci růstu bakterií v bachoru. Kromě toho buněčná stěna kvasinek nepřetržitě produkuje extracelulární proteiny a enzymy.

Erasmus et al. (1992) zaznamenal, že dojnice, jejichž krmná dávka je dotována kvasinkami, vykazují tendenci k vyššímu využití celkového bakteriálního dusíku, mikrobiální bílkoviny a nárůstu amoniakálního dusíku v porovnání s kontrolní skupinou, zatímco množství bypassového dusíku klesá. Pravděpodobně je jeho větší část využita na růst bakterií. Podání probiotik způsobilo nárůst syntézy mikrobiálního proteinu a změny v profilu mikrobiálních aminokyselin (Beharka and Nagaraja, 1991). Nárůst množství dusíku v tenkém střevě by mohl být vysvětlením pro nárůst mléčné produkce. Dojnice, jejichž krmná dávka obsahuje kvasinky, vykazují vyšší obsah bachorového amoniaku. Stewart et al.,

(1997) tento jev vysvětlili zvýšenou proteolytickou a deaminační aktivitou kvasinek v souvislosti s degradací škrobu, proteinů a peptidů v bacheru.

V bacheru v souvislosti se zkrmováním kvasinek dochází i ke zvyšování koncentrace těkavých mastných kyselin jako výsledek degradačního působení celulolytických bakterií, které se mohly v plné míře uplatnit po stabilizaci bacherového pH. Dojnice, které přijímají v krmné dávce kvasinkové kultury, mají signifikantně vyšší obsahy mléčného tuku, jako důsledek zvýšení koncentrace volných mastných kyselin, které jsou jeho prekurzory (Chiquette et al. 2008).

Dojnice, kterým jsou podávány kvasinky v TMR (total mixed ratio) vykazují i vyšší koncentrace amoniakálního dusíku oproti kontrolní skupině jako výsledek proteolytické a deaminační aktivity.

Nedávné výzkumy přidavku živých bakterií do krmné dávky potvrdily i pozitivní vliv sníženého pH na rozvoj nežádoucích patogenních mikroorganismů (Nocek et al., 2002, Beauchemin et al., 2003). Zkrmování kvasinek prokazuje selektivní inhibiční působení například proti *E. coli* (Jensen et al., 2008).

Kvasinky mohou stimulovat i ochranný imunologický systém zvířat. Jejich buněčná stěna vykazuje vazební afinitu k toxinům, podávání kvasinek tak limituje nebezpečí vzniku toxikóz u přežvýkavců.

Opakované testace potvrzují, že přídavek kvasinkových kultur do krmné dávky může zvýšit efektivitu využití krmiva zejména při teplotních stresech u dojníc (Schingothe et al., 2004). Hypertermie negativně ovlivňuje celou řadu parametrů mléčné produkce. Teplotní stres snižuje příjem krmiva více než o 50% a mléčná produkce klesá. Ekonomické ztráty mohou dosahovat až 30% (Fox and Tylutki, 1998). V souvislosti se sníženou dostupností energie a naopak s nárůstem potřeby energie dojnice se dostávají v souvislosti s teplotním stresem do negativní energetické bilance (Ebal et al., 2005).

Zkrmování kvasinek se může významně podílet i na eliminaci nežádoucího působení mykotoxinů na zdravotní stav dojníc. Mykotoxiny jsou nízkomolekulární sloučeniny, které jsou produktem sekundárního metabolismu plísní. Jsou součástí přirozených destrukčních pochodů rostlinných materiálů, vyskytují se tedy v krmivech, koncentrátech i stelivu. Chemicky je identifikováno okolo 300 druhů mykotoxinů a jsou stanoveny maximální přípustné limity pro jednotlivé kategorie zvířat. Relativně nejodolnější je skot vzhledem k degradaci v bacheru. Dojnice však jsou nejcitlivější vzhledem k vysoké spotřebě krmiva, produkčnímu stresu a imunitní odezvě organismu. Zkrmování krmiv obsahujících nadlimitní množství toxinů vyvolává celou řadu onemocnění. Má vliv na imunitní a reprodukční systém, zvyšuje se embryonální mortalita. Je zaznamenán nárůst metabolických onemocnění jako ketóza, objevuje se vyšší četnost mastitidního onemocnění. Suplementace selenu, metioninu, karotenoidů a vitaminů vůbec působí vysoce pozitivně na fyziologické pochody zvířat krmných krmiv s obsahem mykotoxinů. Jako nejslibnější způsob dekontaminace se jeví biologická

detoxikace tzv. biotransformace (Yinnikouris a Jouanny, 2002). Je identifikováno více než 20 bakterií a kvasinek se schopností detoxikovat mykotoxiny (Schatzmayr et al., 2004). Řadí se k nim i pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které prokázaly schopnost snížit jedovatý vliv aflatoxinu na zvířata. Detoxikační roli sehrává esterifikovaný glukomanan, polymer z buněčné stěny kvasinky, který je schopen mykotoxiny poutat, aniž by vznikaly vedlejší toxické produkty nebo metabolity. Nedochází ke změnám nutričních hodnot, obsahu minerálních látek ani dostupnosti vitaminů. Izolace a charakteristika kvasinek, které jsou schopny biotransformovat mykotoxiny, je významným průlomem zavedení biotechnologie do praxe.

Suplementace krmné dávky zejména živými kmeny kvasinek zvyšuje stravitelnost a možnost využití krmné dávky, zvýšenou úroveň využití vlákniny a v souvislosti s tím i produkci kyselin (propionové), které se řadí mezi prekurzory mléčného tuku. Aplikace probiotických kvasinkových kultur do krmné dávky zásadně pozitivně ovlivňuje mikrobiální bacherový metabolismus, zvyšuje příjem sušiny v krmné dávce a má příznivý vliv na obsah nutričních složek mléka (zejména tuku a bílkovin). Přídavek živých kvasinkových kultur potencuje zvýšenou energetickou bilanci krmné dávky. Má jednoznačně vliv na welfare dojníc, jejich užitkovost a reprodukční ukazatele.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumný záměr MSM2672286101).

Literatura

Literatura je k dispozici u autorů.

VYUŽITÍ NEPŘÍMÉ IMPEDANČNÍ METODY PRO STANOVENÍ SPÓR KLOSTRIDIÍ NA PŘÍSTROJI RABIT

Š. Havlíková, E. Kvasničková, V. Černý

Výzkumný ústav mlékárenský, s. r. o. Soběslavská 841, 390 02 Tábor

Application of indirect impedant method for determination of Clostridium spores by RABIT apparatus

Souhrn

V této práci byla testována možnost stanovení spór klostridií máselného kvašení nepřímou metodou měření změny vodivosti v důsledku tvorby a absorpce CO₂ v přístroji RABIT na modelových kmenech. Pro tuto metodu bylo