

Vědecký výbor výživy zvířat

Enzymy ve výživě hospodářských zvířat

**Prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.,
Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

Praha, 2010



Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, Praha - Uhřetěves,
PSČ: 104 01, www.vuzv.cz

ISBN

978-80-7403-065-9

Obsah

Obsah.....	1
1. Úvod	2
2. Endogenní enzymy v trávicím traktu hospodářských zvířat	4
2.1. Enzymová aktivita mikroorganismů v trávicím traktu	5
2.2. Modely soužití mikroorganismů a savců.....	7
2.3. Mikrobiální fermentace v trávicím traktu.....	7
2.4. Vliv exogenních enzymů na střevní mikroflóru hospodářských zvířat.....	11
3. Exogenní enzymy jako krmná aditiva	13
3.1. Celulasy (β -glukanasy)	18
3.2. Xylanasy	20
3.3. Fytasy.....	22
4. Specifika použití enzymů pro jednotlivé kategorie zvířat	27
4.1. Fytasa v chovech drůbeže, prasat a akvakultuře.....	27
4.2. Celulasy a hemicelulasy u prasat a drůbeže	28
5. Závěr.....	30
Reference.....	31

1. Úvod

Začátek moderního přístupu k využívání enzymů se datuje do roku 1874, kdy byla poprvé izolována frakce enzymů, tzv. rennetz telecích žaludků a využita v procesu výroby sýru. Tato směs založená zejména na chymase (renninu) a dalších, v menším množství zastoupených proteas a lipas umožňuje v žaludku telat trávit kasein. Od té doby našly enzymy uplatnění v detergentech, výrobě papíru, kožařství a textilním průmyslu. Dalším ohromným sektorem, kde se uplatňují je potravinářský průmysl, zejména výroba pečiva, vína, sýrů, ovocných džusů a kávy.

Využití enzymů ve výživě zvířat je poměrně mladou strategií. Ačkoliv jsou enzymy vědomě či nevědomě člověkem využívány po tisíciletí v procesech jako vinařství, sýrařství nebo maso-zpracovatelském průmyslu, jejich první komerční využití ve výživě zvířat spadá do osmdesátých let 20. století, kdy se na trhu objevil přípravek na bázi odpadních enzymů z kvasného průmyslu pro zvýšení využitelnosti ječmene u drůbeže. Následoval rychlý vývoj desítek aditiv na bázi enzymů pro využití ve výživě drůbeže a v menší míře prasat. Výzkum exogenních enzymů začal ve dvacátých letech minulého století a k dnešnímu dni bylo publikováno více než 1300 studií. Použití enzymů jako krmných aditiv má dramatický vliv na využitelnost některých krmiv ve výživě hospodářských zvířat, zejména drůbeže. Jejich význam stoupá s používáním méně jakostních obilovin, jako je ječmen a pšenice. Předpokládá se, že jejich budoucí význam bude nadále stoupat spolu se zájmem průmyslu o jejich vývoj, výrobu a klesající cenu.

V roce 2005 se hodnota trhu s enzymy odhadovala na 2 miliardy USD (Godfrey a West, 1996), z toho trh s krmnými enzymy je odhadován na 360 milionů USD (Brufau *et al.*, 2006). Obrovským trhem pro krmné enzymy se stává Čína, vzhledem k masivnímu rozvoji chovů drůbeže při použití málo kvalitních krmiv.

Výzkum v oblasti krmných enzymů se zaměřuje na oblasti jako je zvýšení jejich účinnosti ve střevě, tepelné a oxidativní stability, odolnosti vůči prostředí žaludku případně bachoru enzymů a rozšíření specifických enzymů pro různé druhy zvířat na jiné kategorie zvířat, včetně aquakultury, zájmových chovů a chovů exotických zvířat (Sheppy *et al.*, 2001). Současné možnosti využití geneticky modifikovaných mikroorganismů umožňují produkci jakýchkoliv enzymů na bázi rekombinantních proteinů v GRAS („generally recognized as

safe“) hostitelích. Otevírají se možnosti v použití lipas, proteas a amylas, geneticky designovaných pro využití specifického substrátu a zvířecího druhu. Stoupá zájem o enzymy i z pohledu ochrany životního prostředí, kdy jejich využívání omezuje environmentální zátěž, kterou intenzivní živočišná výroba přináší.

Enzymy existují prakticky všude. Jsou přirozeně produkovány živými organismy. Tyto proteiny katalyzují a urychlují chemické reakce probíhající v živých organismech od jednobuněčných, přes rostliny až po vyšší živočichy a umožňují jim tím existenci. Snižují aktivační energii reakce. Do dnešního dne jich bylo popsáno 3000. Tří-dimenzionální struktura enzymů, daná prostorovým navázáním aminokyselin determinuje specifitu enzymu. Podmínky, které vedou ke změně, posunu, této složité struktury, jako změna teploty, pH, oxidace při skladování, nižší vodní aktivita apod., vedou i ke změně aktivity enzymu. Většina enzymů nejlépe působí při středně vysokých teplotách a neutrálním pH (Marquardt a Brufau, 1997).

2. Endogenní enzymy v trávicím traktu hospodářských zvířat

Celkový přehled hlavních endogenních enzymů u hospodářských zvířat a člověka je uveden v Tab. 1. Jedná se v podstatě výhradně o hydrolasy, tj. enzymy hydrolyticky štěpící glykosidické, peptidické a esterové vazby v molekulách sacharidů, bílkovin a tuků. Převážnou funkcí je uskutečňování trávicích procesů, výjimkou je lysozym, který má také antimikrobiální účinky. Při trávení je lysozym významný u přežvýkavců, kde rozkládá peptidoglykan buněčné stěny bachorových mikroorganismů a podílí se na trávení chitinu.

Ve slinách hospodářských zvířat není velká aktivita endogenních trávicích enzymů, detekovatelný je pouze lysozym a u prasete také v omezené míře amylasa s aktivitou asi 100× nižší než u člověka (Reece, 1998). Rozdíly jsou také mezi produkcí enzymů u mláďat a dospělců. U mláďat přežvýkavců je vysoká produkce chymasy (renninu), která umožňuje větší příjem mléka v porovnání s mláďaty ostatních savců.

Tab. 1: Přehled hlavních endogenních enzymů v trávicím traktu hospodářských zvířat a člověka

Enzym	Výskyt	Substrát	Konečný produkt	Poznámka
Amylasy	sliny	škrob	maltosa, glukosa	ve slinách pouze u člověka a prasete
Lysozym	sliny, žaludeční šťáva, střevní šťáva	peptidoglykan, chitin	aminocukry	Vysoká aktivita ve slezu přežvýkavců
Pepsin	žaludeční šťáva	bílkoviny	peptidy, aminokyseliny	
Katepsin	žaludeční šťáva	bílkoviny	peptidy, aminokyseliny	
Žaludeční lipasa	žaludeční šťáva	tuky	mastné kyseliny, glycerol, monoglyceridy	U kojenců je lipasa také v dutině ústní
Chymosin (rennin)	žaludeční šťáva	bílkoviny	peptidy, aminokyseliny	u mláďat přežvýkavců

Enzym	Výskyt	Substrát	Konečný produkt	Poznámka
Trypsin	pankreatická šťáva	bílkoviny	peptidy, aminokyseliny	
Chymotrypsin	pankreatická šťáva	bílkoviny	peptidy, aminokyseliny	
Pankreatická amylasa	pankreatická šťáva	škrob	maltosa, glukosa	
Pankreatická lipasa	pankreatická šťáva	tuky	mastné kyseliny, glycerol, monoglyceridy	
Karboxypeptidasa	pankreatická šťáva	polypeptidy	peptidy, aminokyseliny	
Enterokinasa	střevní šťáva	trypsinogen	trypsin	funkcí je aktivace trypsinu
Erepsin – aminopeptidasy	střevní šťáva	polypeptidy	peptidy, aminokyseliny	
Dipeptidasy	střevní šťáva	dipeptidy	aminokyseliny	
Maltasa	střevní šťáva	maltosa	glukosa	
Laktasa	střevní šťáva	laktosa	glukosa, galaktosa	chybí u drůbeže
Invertasa	střevní šťáva	sacharosa	glukosa, fruktosa	
Fytasa	střevní šťáva	kyselina fytová	inositolfosfáty, orthofosfát, myo-inositol	nízká aktivita u člověka

(Arendarčík 1986; Reece 1998; Marounek *et al.*, 2003)

2.1. Enzymová aktivita mikroorganismů v trávicím traktu

Mikroorganismy jsou vždy zastoupeny v trávicím traktu konvenčních zvířat a jsou tedy i přítomny mikrobiální enzymy. Protože je trávicí trakt prostředí spíše anaerobní (mikroaerofilní až striktně anaerobní), probíhá zde mikrobiální fermentace. Charakteristickým znakem, kterým se konvenční zvířata odlišují od bezmikrobních (germ-free) zvířat je přítomnost konečných produktů kvašení - těkavých mastných kyselin (Tab. 2). Konvenční zvířata mají také jiné složení střevních plynů.

Tab. 2: Fyzikální, chemické a mikrobiologické charakteristiky střevních kompartmentů, v nichž probíhá mikrobiální fermentace

Charakteristika	Vlastnost
<i>Fyzikální</i>	
pH	5,5–6,9
Redoxpotenciál	-350 až -400 mV
Teplota	38–41°C
Osmolarita	250–350 mOsmol/kg
Sušina	10–18 %
Chemické	
Plynná fáze (%)	CO ₂ , 65; CH ₄ , 27; N ₂ , 7; O ₂ , 0.6; H ₂ 0.2
<i>Chemické</i>	
Těkavé mastné kyseliny (mM)	Acetát 60–90 Propionát 15–30 Butyrát 10–25 Vyšší a s rozvětveným řetězcem 2–5
Netěkavé mastné kyseliny (mM)	Laktát < 10
Aminokyseliny a oligopeptidy	< 1mM přítomen 2–3 h po příjmu potravy
Amoniak	2–12 mM
Rozpustné sacharidy	< 1mM přítomen 2–3 h po příjmu potravy
Nerzpustné polysacharidy z potravy (celulosa, hemicelulosa, pektin)	Vždy přítomny
Nerzpustné polysacharidy endogenní (mukopolysacharidy)	Vždy přítomny
Lignin	Vždy přítomny
Minerálie	Hodně Na, obecně dostatek
Stopové prvky/vitamíny	Vždy přítomny, hodně vit. B
<i>Mikrobiologické</i>	
Růstové faktory	Vždy přítomny, puriny, pyrimidiny, neznámé faktory
Mikrobiologické	
Bakterie	10–11 log CFU/g, > 200 druhů
Prvoci	4–6 log CFU/g, 25 rodů
Anaerobní houby	3–5 log CFU/g, 4 rody
Bakteriofágy	7–9 log částic/ml

(Mackie, 1996)

2.2. Modely soužití mikroorganismů a savců

Trávicí trakt savců je poměrně rozměrné prostředí, jehož funkcí je nejen zpracování, ale také uchovávání potravy. Vždy přítomné mikroorganismy, hlavně bakterie, mohou za příznivých podmínek velmi rychle růst, a tak se často mohou dostat do „konfliktu“ s hostitelem. Podle míry soutěživosti makroorganismů a mikroorganismů rozlišujeme tři modely jejich soužití (Mackie 1996):

- Kompetiční
- Kooperační
- Kombinovaný

Kompetiční model je u masožravců charakterizován malým výskytem mikroorganismů v žaludku, vzhledem k silné produkci kyseliny solné. Mikroby se vyskytují až v kaudálních částech trávicího traktu, kde rozkládají nestrávené zbytky potravy.

Kooperační model je u přežvýkavců (skot, ovce, koza), mikroorganismy jsou přímo nezbytné pro trávení rostlinných polysacharidů. Kromě pomoci při trávení, mikroorganismy v předžaludcích přežvýkavců také vytvářejí kvalitní proteiny a vitamíny.

Kombinovaný model je u nepřežvýkavých býložravců (kůň, slon, králík), kde se mikroorganismy podílejí na trávení rostlinných polysacharidů v tlustém nebo ve slepém střevě.

2.3. Mikrobiální fermentace v trávicím traktu

Místa s největší aktivitou mikrobiálních enzymů jsou předžaludky přežvýkavců, slepé střevo nebo tlusté střevo nepřežvýkavých býložravců a všežravců, a slepá střeva drůbeže. Probíhá zde především fermentace převážně rostlinných polysacharidů a oligosacharidů, dále rozklad bílkovin (nestrávené zbytky, trávicí enzymy) a dusíkatých látek. Mikroorganismy zde také zasahují do metabolismu žlučových kyselin a provádějí i syntézu např. aminokyselin.

V předžaludcích přežvýkavců probíhá zejména rozklad rostlinných polysacharidů, což je proces výhradně mikrobiální. Působí zde v první řadě bakterie, významný je i podíl anaerobních hub a v omezené míře jsou aktivní i protozoa. Rozkládány jsou jak zásobní

(škrob, inulin), tak strukturní (celulosa, hemicelulosa, pektin) polysacharidy. Sacharolytické enzymy izolované z bacherových mikroorganismů jsou uvedeny v Tab. 3.

U člověka je jedním z hlavních substrátů pro bakteriální fermentaci v tračníku rezistentní škrob. Ten je využíván bakteriemi rodů *Bacteroides* a *Bifidobacterium* (Silvi *et al.*, 1999) a jak bylo v nedávno prokázáno také rody *Roseburia* a *Butyrivibrio* (Ramsay *et al.*, 2006), které produkují pro kolonocyty prospěšný butyrát.

V bacheru a tlustém (slepém) střevě jsou aktivní i jiné enzymy než sacharolytické hydrolasy. Probíhá zde i trávení dusíkatých látek. Proteolytická aktivita byla, spíše než na čistých kulturách, sledována na směsích bacherových mikroorganismů. Proteolytickou aktivitu má asi 12–43 % bakterií, přičemž jsou to hlavně sacharolytické druhy rodů *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Selenomonas*, *Eubacterium*, *Lachnospira* a *Streptococcus*. Mnohem menší proteolytickou aktivitu mají protozoa. Enzymová aktivita anaerobních hub je prozkoumána nejméně (Cotta a Russell 1996; Lee *et al.*, 2002).

Tab. 3: Hlavní sacharolytické enzymy bacherových mikroorganismů

Bakterie	Gen	Enzym	Substrát ^a
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>celA</i>	endoglukanasa	BBG, CMC, L
<i>B. fibrisolvens</i>	<i>endl</i>	endoglukanasa	L, CMC, pNPC, G ₄ -G ₆
	<i>cedl</i>	celodextrinasa	CMC, pNPC
	<i>bgIA</i>	β-glukosidasa	G ₂ -G ₅
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>cel-3</i>	endoglukanasa	CMC, L, BBG
	<i>endB</i>	celodextrinasa	CMC, L, BBG
	<i>cedA</i>	endoglukasana	pNPC, G ₃ -G ₆
	<i>endA_{PS}</i>	endoglukanasa	CMC, Avicel
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Egl</i>	endoglukanasa	CMC
	<i>celA</i>	endoglukanasa	CMC, XYN
	<i>egIV</i>	endoglukanasa	CMC
	<i>pRA201</i>	β-glukosidasa	G ₂ -G ₆
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>endA</i>	glukanasa	CMC, L, G ₅ -G ₆
	<i>celA</i>	celodextrinasa	pNPC, G ₄ -G ₆
	<i>celB</i>	endoglukanasa	CMC
	<i>xynA</i>	xylanasa	XYN
	<i>xynB</i>	xylanasa	XYN, pNPC

Bakterie	Gen	Enzym	Substrát ^a
<i>F.succinogenes</i>	<i>xynC</i>	xylanasa	XYN, CMC
<i>Neocallimastix patriciatum</i>		xylosidasa	pNPX
<i>Neocallimastic frontalis</i>		xylosidasa	XYN, CMC
<i>Lachnospira multiparus</i>		poly (1,4- α -L) galakturonat lyasa	PGA, TGA
<i>Selenomonas ruminantium</i>		1,4- α -D- galaktosiduronat hydrolasa	TGA
<i>Streptococcus bovis</i>		α -amylasa	amylosa, amylopektin
<i>Ruminobacter amylophilus</i>		α -amylasa	amylosa, amylopektin

^aCMC-karboxymetylcelulosa, BBG- β -glukan (ječmen), pNPC-p-nitrofenyl- β -D-celobiosid, XYN-xylan, PGA-polygalakturonat, TGA-trigalaktouronat. (podle Forsberg *et al.*, 1996, upraveno).

Aktivitou hydrolytických enzymů v trávicím traktu králíků se podrobně zabývali Marounek *et al.* (1995). Z výsledků vyplývá, že mikroorganismy se výhradně podílejí na štěpení celulosy, hemicelulosy, inulinu, pektinu a močoviny a participují i na rozkladu škrobu, lipidů a bílkovin (Tab. 4). Nejvyšší aktivita mikrobiálních enzymů je ve slepém střevě, kde je 2–6 krát vyšší než v tračníku. Mikrobiální pektinasy jsou poměrně aktivní i v žaludku, pravděpodobně vlivem koprofágie.

Tab.4. Aktivita hydrolytických enzymů v trávicím traktu králíků

Enzym	Původ	Žaludek	Tenké střevo	Slepé střevo	Tračník
Lipasa ¹	e, m	-	22	198	98
Amylasy ²	e, m	-	1786	3081	772
Celulasa ²	m	-	29	303	57
Xylanasa ²	m	-	147	1505	370
Pektinasy ²	m	979	384	3046	724
Inulinasa ²	m	-	39	257	60
Laktasa ³	e, m	-	57	525	83
Invertasa ³	e, m	242	265	899	223
Maltasa ³	e, m	-	1168	2824	566

Enzym	Původ	Žaludek	Tenké střevo	Slepé střevo	Tračník
β-glukosidasa ³	m	-	15	455	101
Ureasa ⁴	m	-	63	2100	384
Proteinasa ⁵	e, m	4322	1176	3023	805

¹Vyjádřeno jako mmol butyrátu vzniklého štěpením tributyrátu/h; ²Vyjádřeno v mg vzniklého příslušného monomerního sacharidu/h; ³Vyjádřeno v mg vzniklé glukosy/h; ⁴Vyjádřeno v mg močoviny hydrolyzované/h; ⁵Vyjádřeno jako mg rozloženého azokaseinu/h.; e, endogenní; m, mikrobiální; podle Marounek *et al.*, (1995), upraveno.

U drůbeže je velký výskyt laktobacilů ve voleti, kde dochází k fermentaci jednoduchých cukrů. Laktobacily drůbeže mají také amylolytickou aktivitu (Champ *et al.*, 1983). Kuřata po vylíhnutí nemají na rozdíl od většiny hospodářských zvířat a člověka žádnou aktivitu endogenní laktasy. U dospělé drůbeže je však aktivita laktasy v celém trávicím traktu vysoká vlivem symbiotické mikroflóry (hlavně laktobacily a bifidobakterie). Naopak celulólytická aktivita je u drůbeže zcela zanedbatelná a to i ve slepých střevech, kde dochází hlavně k rozkladu nevstřebaných aminokyselin, tvorbě aminů a uvolňování amoniaku (Larbier a Leclercq, 1994).

V trávicím traktu mikroorganismy také rozkládají kyselinu fytovou a zlepšují stravitelnost a vstřebávání fosforu. Fytasová aktivita je dobře popsána u bachorových bakterií *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella ruminicola*, *Mitsuokella multiacidus* a *Treponema* spp (Yanke *et al.*, 1998).

Biosyntetické bakteriální enzymy fungují jak v bachoru, tak kaudálních částech trávicího traktu. Glutamát dehydrogenasa, enzym účastnící se asimilace amoniaku ve střevě byl nalezen u rodů *Porphyromonas* a *Clostridium*. Další enzymy biosyntézy dusíkatých látek nalezené u střevních bakterií jsou: glutamát syntasa (*Klebsiella*, *E. coli*), glutamin syntetasa (*Bacillus*, *Clostridium*), asparagin syntetasa (*E. coli*, *Streptococcus bovis*) a další. Střevní bakterie se také podílejí na syntéze polyaminů, pyrimidinů a purinů jako prekurzorů syntézy nukleových kyselin (Morrison a Mackie 1996).

Různé střevní bakterie (rody *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Lactobacillus*) se účastní biotransformace žlučových kyselin, prostřednictvím dekonjugace, oxidace, epimerizace, dehydroxylace, esterifikace a desulfatace. Zatímco dekonjugace a desulfatace zvyšuje jejich toxicitu (Binder *et al.*, 1975), esterifikace a epimerizace hydroxy žlučových kyselin toxicitu

naopak snižuje (Armstrong a Carey 1982). U mnoha druhů rodu *Eubacterium* a také u některých bifidobakterií a klostridií bylo zjištěno, že redukují cholesterol na koprostanon a koprostanol a snad tak mohou přispívat k jeho vylučování výkaly (Baron a Hylemon, 1996). Střevní bakterie mohou využívat jako substrát také antibiotika a jiná léčiva. Sousa *et al.* (2008) uvádí, že různé bakterie metabolizují např. cloramphenikol, nitrazepam, metronidazol, risperidon, metafetamin a celkem dalších 30 v současné době používaných léčiv a mohou tak pozměňovat jejich účinky a/nebo toxicitu.

2.4. Vliv exogenních enzymů na střevní mikroflóru hospodářských zvířat

Trávicí trakt hospodářských zvířat je místem masivního výskytu rozličných mikroorganismů, hlavně bakterií. Střevní mikroflóra reaguje bezprostředně na vnější podněty, z nichž hlavními jsou složení potravy, probiotika, prebiotika, antibiotika, růstové stimulanty, kokcidiostatika a také exogenní enzymy (Bedford a Apajalahti, 2001). Přídavek exogenních enzymů často přinesl zlepšení stravitelnosti živin a řada autorů zaznamenala následné změny ve složení střevní mikroflóry (Hock *et al.*, 1997; Vahjen *et al.*, 1998). Vzhledem k relativně malému počtu experimentů na prasatech, většina údajů v této kapitole platí pro hrabavou drůbež.

Exogenní enzymy jsou většinou přidávány jako opatření proti problematickým složkám krmiv a krmných směsí jako jsou zrniny, zejména rýže a ječmen. Přídavek enzymů vede ke zvýšení stravitelnosti vlivem depolymerizace vysoce viskózních polysacharidů v buněčných stěnách. Vysoce viskózní tráveniny bývá přičítán vliv na zhoršenou extrakci živin ze střeva (Bedford a Classen 1992; Classen *et al.*, 1995). Jak však bylo zjištěno dávno předtím, přílišná viskozita tráveniny může být alespoň částečně snížena přidávkou antibiotik (Moran a McGinnis 1968). Navíc problémy s viskozitou prakticky nejsou u bezmikrobních (germ-free) zvířat (Schutte a Langhout, 1999). Jedná se tedy pravděpodobně o interakci mezi exogenně podávaným enzymem, krmivem a také střevní mikroflórou. Podle současných poznatků tedy exogenní enzymy degradující buněčné stěny mají ve střevě vlastně dva typy aktivit: odnímají, nebo naopak zásobují střevní mikroflóru substrátem. První aktivita se uplatňuje v tenkém střevě, druhá v tračníku a ve slepých střevech (Bedford a Apajalahti, 2001).

V tenkém střevě probíhá kompetice o živiny mezi hostitelem a jeho mikroflórou. U drůbeže dochází k osídlování tenkého střeva již v prvních hodinách po vylíhnutí, nejprve převládají gram pozitivní bakterie (streptokoky, laktobacily) později se objevují i gram negativní anaerobní mikroorganismy (Morishita *et al.*, 1992). Dramatické změny ve složení mikroflóry

tenkého střeva byly pozorovány při porovnání vlivu krmiva na bázi rýže a s převažujícím obsahem kukuřice. Krmná směs s rýží měla za následek vyšší zastoupení anaerobních, zvláště sporulujících bakterií. Stejně bakterie byly také stimulovány přidavkem pektinu do kukuřičné krmné směsi (Wagner a Thomas, 1987). Přídavek exogenních enzymů naproti tomu redukoval viskozitu chymu a redukoval množství mikroorganismů v ileu (Choct *et al.*, 1999). Přídavek enzymů pravděpodobně zvyšoval tempo odstraňování škrobu a proteinů z tenkého střeva, kde tudíž zbývalo méně živin pro mikroby. Obecně platí, že čím méně stravitelná dieta, tím více mikroorganismů. Přídavek xylanasy vedl k 60% snížení mikrobiální populace tenkého střeva u 21 denních kuřat krmených směsí na bázi pšenice (Bedford a Apajalahti, 2001). Ještě větší snížení mikrobiální populace přinesl přídavek avoparcinu. Mechanismus účinku redukce mikroorganismů u antibiotika jiný (inhibiční) než u endogenních enzymů (snížení živin). Přídavek exogenních enzymů obecně zvyšuje stravitelnost živin, hlavně polysacharidů jako je škrob (Wyatt *et al.*, 1999; Bedford a Apajalahti, 2001).

V tlustém střevě mají exogenní enzymy odlišný vliv než v tenkém střevě. Nejčastěji používané xylanasy a celulasy odštěpují z polysacharidů monomery (xylosu a glukosu) a také oligomery, které v tlustém a slepém střevě nemohou být vstřebány a zůstávají ve vodném roztoku, kde slouží jako snadno fermentovatelný substrát pro bakterie. Zkrmování xylo-oligomérů vedlo ke trojnásobnému zvýšení koncentrace acetátu caecu krysu (Bedford a Apajalahti, 2001). Přídavek xylanasy také vedl ke změně střevní mikroflóry u drůbeže, zvýšil se počet xyloso-fermentujících bakterií, naopak klesl počet laktobacilů a enterokoků jejichž dekonjugační aktivita na žlučové soli negativně ovlivňuje stravitelnost tuků (Schutte a Langhout 1999). Jiní autoři také zjistili lepší stravitelnost vitamínů a pigmentů rozpustných v tucích (Hock *et al.*, 1997).

Parker *et al.* (2007) podávali exogenní enzymy (Avizyme[®]) kuřatům vakcinovaným proti kokcidiose. Následná experimentální infekce kokcidiemi se projevila významně nižším výskytem lézí ve slepých střevech kuřat krmených enzymy oproti kontrolní skupině. Autoři tento efekt rovněž přičítají změně mikroflóry.

Jako další vedlejší účinky interakcí mezi hostitelem, mikroflórou a exogenními enzymy je uváděno ovlivnění koncentrace polyaminů a těkavých mastných kyselin (Silva a Smithard, 1996; Choct *et al.*, 1999). Existují velké rozdíly mezi složením mikroflóry u různých jedinců, ale ještě více mezi různými chovy, což znesnadňuje porovnání různých experimentů. Mikroflóra je ovlivněna použitými napáječkami, signifikantně více mikroorganismů je při chovu na podestýlce, než v klecových chovech (Bilgili *et al.*, 1999).

3. Exogenní enzymy jako krmná aditiva

Vyšší organismy využívají k trávení potravy enzymy, ať už ty, které si produkují sami, nebo ty, které jsou produkovány mikroorganismy trávicího traktu. Účinnost trávení zdaleka nedosahuje účinnosti 100 %, proto využití exogenních enzymů je vnímáno jako rozšíření možností trávicího traktu zvířete. I přes pokroky ve šlechtění nových krmných odrůd obilovin a dalších krmiv, jejich krmná jakost není optimální a reálná stravitelnost je nižší než předpoklad a tabulkové hodnoty. Využití enzymů jako aditiv často vede ke zvýšení stravitelnosti špatně stravitelných krmiv a využití jejich nutričního potenciálu nezávisle na variabilní kvalitě.

Snižují vliv variability obsahu nutričních látek v různých šaržích a zdrojích dodaného krmiva a vedou k uniformnější produkci ve skupině zvířat. Velmi důležitý je environmentální aspekt. Pokud zvířata méně konzumují s vyšší konverzí, méně odchází ve výkalech. Použití enzymů průměrně snižuje množství výkalů o 20 % a exkreci dusíku u prasat o 15 %, u drůbeže až o 20 %.

Enzymy na Evropském trhu s krmnými aditivy

Registrace a správa krmných aditiv spadá v EU do kompetence Registru doplňkových látek ve Společenství, regulací (ES) 1831/2003 (rev. 72). Všechny látky, které projdou schvalovacím řízením a jsou povoleny pro využití ve výživě zvířat ve státech EU jsou uvedeny v Příloze 1 dokumentu. Podle registru jsou doplňkové látky rozděleny do čtyř skupin: 1) Technologické, 2) Senzorické, 3) Nutriční, 4) Zootechnické. Skupina Zootechnických doplňkových látek je dále členěna do 4 funkčních skupin, kdy většina enzymů je registrovaných ve funkční skupině 4a, což jsou „látky podporující trávení“.

Tab. 5: Enzymy registrované dle Registru doplňkových látek ve společenství regulací (ES) No 1831/2003 (rev. 72) jako látky podporující trávení (kat. 4a)

Enzym	kód 4aXX	IUB No.	výrobce (produkt)	mikroorganismus
3-fytasa	1600	EC 3.1.3.8	BASF (Natuphos®)	<i>Aspergillus niger</i> (CCBS 109.713)

Enzym	kód 4aXX	IUB No.	výrobce (produkt)	mikroorganismus
3-fytasa	1	EC 3.1.3.8	Adisseio (Rovabio [®])	<i>Penicillium funiculosum</i> (CBS 111 433)
6-fytasa	5	EC 3.1.3.26	AB Vista (Quantum Phytase [®])	<i>Pichia pastoris</i> (DSM 15927)
6-fytasa	6	EC 3.1.3.26	DSM	<i>Aspergillus oryzae</i> (DSM 17594)
6-fytasa	1614	EC 3.1.3.26	DSM (Ronozyme [®])	<i>Aspergillus oryzae</i> (DSM 14223)
6-fytasa	1640	EC 3.1.3.26	Danisco (Phyzyme [®])	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (ATCC 5233)
Endo-1,4-β- xylanasa	1606	EC 3.2.1.8	Beldem (Belfeed [®])	<i>Bacillus subtilis</i> (LMG S-15136)
Endo-1,4-β- xylanasa	1613	EC 3.2.1.8	SAF-ISIS (Safizym [®] X)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (CNCM MA 6-10W)
Endo-1,4-β- xylanasa	11	EC 3.2.1.8	Danisco (Xylanase [®])	<i>T. reesei</i> (ATCC PTA 5588)
Endo-1,4-β- xylanasa	62	EC 3.2.1.8	BASF (Natugrain [®])	<i>A. niger</i> (CCBS 109.713)
Endo-1,4-β- xylanasa, 8 přípravek		EC 3.2.1.8	Roal Oy - AB Vista (Econase [®])	<i>T. reesei</i> (CBS 114044)
Endo-1,4-β-xylanasa, 10 subtilisinu a alfa- amylasa, směsný přípravek		EC 3.2.1.8 EC 3.4.21.62 EC 3.2.1.1	Danisco (Avizyme [®] , Porzyme [®] etc.)	<i>T. reesei</i> (ATCC PTA 5588) <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 2107) <i>B. amyloliquefaciens</i> (ATCC 3978)
Endo-1,4-β- xylanasy a 7 endo-1,4-glukanasa, směsný přípravek		EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.4	DSM (Roxazyme [®])	<i>A. niger</i> (CBS 109.713)
Endo-1,4-β-xylanasa a 9 endo-1,3(4)-β- glukanasa, směsný přípravek		EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.4	Aveve (AveMix [®])	<i>T. reesei</i> (MUCL 49755) <i>T. reesei</i> (MUCL 49754)

Enzym	kód 4aXX	IUB No.	výrobce (produkt)	mikroorganismus
Serin endopeptidasa	13	EC 3.4.21	DSM (Ronozyme [®] ProAct)	<i>B. licheniformis</i> (DSM 5749)
Endo-1,4- β -mananasa	3	EC 3.2.1.78	ChemGen (Hemicell [®])	<i>B. lentus</i> (ATCC 55045)

K dnešnímu dni bylo v EU autorizováno kolem 40 enzymů pro použití v různých kategoriích zvířat, drůbeže, prasat a dojnic (Brufau *et al.*, 2006). Trhu s enzymy v EU dominují čtyři skupiny: V Tab. 5 je přehled vybraných aditiv registrovaných v 4a kategorii.

Enzymy degradující vlákninu

Jeden z velkých limitů výživy zvířat je fakt, že monogastři (prasata, drůbež) neprodukují enzymy k trávení vlákniny. Při krmných směsích založených na pšenici, ječmeni, žitu nebo tritikale, značnou část vlákniny tvoří rozpustné a nerozpustné polysacharidy hemicelulosity, nejčastěji arabinoxylany, a β -glukany (White *et al.*, 1983, Bedford a Classen, 1992). Rozpustná vláknina zvyšuje viskozitu tráveniny v tenkém střevě a tím narušuje stravitelnost živin, jejich přístupnost pro enzymy a mechanicky znemožňuje difuzi a pohyb živin ke střevní stěně. Výsledkem je snížený přírůstek a další poruchy, jako např. nespecifická kolitida u prasat, mazlavé výkaly a popáleniny končetin, tzv. „hock burns“ časté u brojlerů.

Obsah vlákniny v obilovinách je velmi variabilní v závislosti na varietě, lokalitě, geografických a klimatických podmínkách oblasti. Proto je značná i variabilita mezi dietami. Na rozkladu vlákniny se podílí enzymy celulasy, na rozkladu arabinoxylanů, tedy složek hemicelulosity zase xylanasy a β -glukanasy štěpící komplexy β -glukanu. Využití těchto enzymů snižuje variabilitu v produkci, vede k uniformní konverzi živin, přírůstkům, a zvyšuje konzistentnost využití krmiv. Dále je známo, že enzymy pozitivně ovlivňují složení mikroflory a snižují riziko incidence průjmů.

Vzhledem k heterogenitě molekuly celulosity a hemicelulosity, množství různých typů vazeb, případně substituentů není možné hydrolyzovat tento komplex s pomocí jednoho enzymu. Rostliny a mikroorganismy si vyvinuly systém koktejlů enzymů, tzv. celulosom nebo xylosom. Jinou strategií byl vznik tzv. multifunkčních enzymů (Khandeparker, 2008).

Enzymy degradující kyselinu fytovou

Fosfor je minerál potřebný pro mineralizaci kostí, dále se podílí na imunitě, ovlivňuje plodnost. Prasata a drůbež jsou schopny strávit v průměru 30–40 % fosforu přítomného v potravě rostlinného původu, kdy zbytek zůstává vázán ve vazbě s kyselinou fytovou, pro zvířata v nepřístupné formě. Pro většinu kategorií zvířat se tak fosfor musí přidávat. Více než polovina fosforu je tedy vylučována do prostředí a přispívá k environmentální zátěži, eutrofizaci povrchových vod. Přídavek fytasy vede k hydrolýze fosforu z fytátových vazeb a umožní jeho vstřebání a využití. Přídavek fytasy tak vede ke snížení ceny krmiva při současném snížení environmentální zátěže.

USA je v současné době největším producentem drůbežího masa na světě. S produkcí brojlerů, krůt a vajec v hodnotě 29 miliard USD, z čehož brojleři představují 22 miliard USD (2004). Většina produkce je zajištěna několika málo společnostmi, z nichž světová jednička je firma Tyson Foods. Firma kontroluje každý článek řetězce výroby od šlechtění hybridů přes produkci a míchání krmiv. Všechny používané směsi obsahují enzymy a návratnost investice je 2:1 (Sheppy, 2001).

V osmdesátých letech začaly být enzymy využívány podle přístupu „žito + β -glukanasa = pšenice“ a ten se v té době dočkal širokého uplatnění i v malo- a středně velké výrobě. Dalším pozdějším z let devadesátých je koncept „pšenice + xylanasa = kukuřice“, který se ujal od roku 1996. Odhaduje se, že celosvětově 65 % všech směsí založených na viskózních obilovinách pro brojlerů obsahuje krmné enzymy degradující vlákninu, v Evropě až 80 %. V oblasti výživy prasat je penetrace výrazně nižší, kolem 10 %. Geograficky se dá pozorovat vyšší penetrace krmných enzymů na trhu v Evropě, Kanadě a Austrálii, kde se více využívají k formulaci směsí viskózní obiloviny. Méně pak v USA, kde je základem kukuřice nebo Asijsko-pacifický region, kde jím je sója. Tyto regiony představují výzvu pro vývoj nových exogenních enzymů pro nové aplikace, používání krmných enzymů u kukuřičných nebo sójových diet u drůbeže je kolem 5 %. Globálnímu využití se těší fytasa. Nezávisle na regionu je její rozšíření v celosvětových chovech kolem 8 %, ve výživě prasat a drůbeže, zejména nosnic. U fytasy se nabízí možnost obsáhnout trh s produkcí brojlerů, kde je využití zatím nižší.

Výzkum a vývoj v oblasti krmných enzymů se zaměřuje na překonání problémů s termolabilitou a oxidační stabilitou, která umožní snazší a pohodlnější použití, např. včetně možnosti granulace. V současné době je možnost enzymy nanášet na granule většinou pouze nástřikem.

Enzymy degradující protein

Protein v dietě pochází z různých zdrojů o různé kvalitě a stravitelnosti. Plodiny, které jsou do diety začleňovány jako proteinová krmiva, např. sója často obsahují antinutriční složky, jako jsou lektin, inhibitory trypsinu. Ty snižují absorpci aminokyselin na povrchu střeva a dokonce mohou vést k poškození absorpčního povrchu. Navíc, mladá zvířata často nejsou schopna složitý proteinový komplex ze sojové moučky (glycinin, β -konglycinin) využít. Proteasy jsou ve velké míře produkovány rostlinami, příkladem jsou proteasy z ananasu *Ananas* sp. (bromelain), ficusu *Ficus* sp. (ficin) nebo papáji *Papaya carica* (papain), živočichy (Pepsin, pankreatin, etc.) nebo mikroorganismy (*A. oryzae*, *Rhizopus oligosporus* apod.) Proteasy mohou zvyšovat nutriční kvalitu proteinu a snižovat vylučování N ve výkalech.

Samy enzymy musí odolávat prostředí trávicího traktu zvířete a činnosti jeho endogenních enzymů. Proteasy tvoří součást komplexního enzymatického přípravku. Spektrum použití je vysoké, zejména u diet s vysokým zastoupením sóji.

Enzymy degradující škroby

Pšenice v Evropě nebo kukuřice v zámoří bývá považována za zlatý standard krmiv. Například kukuřice je poměrně málo stravitelná. U brojlerů ve stáří 4–21 dní je stravitelnost škrobu z kukuřice pod 85 % (Noy a Sklan, 1994). Stravitelnost škrobu z pšenice se často v literatuře uvádí kolem 93–98 %, ale může být i nižší, jako 82 % jak bylo popsáno v několika studiích u australských odrůd. V Evropě se mění pohled na pšenici jako základní složku krmiv jako na něco co již nelze nutričně pozvednout. Přídavek amylasy do krmiva může vést k vyšší a rychlejší využitelnosti škrobu. Efekt je zejména pozorovatelný u selat po odstavu, kdy dochází ke krátkodobému propadu přírůstku z důvodu přizpůsobování se novým podmínkám, výživě, prostředí a změnám v imunitním systému. Amylasy v tomto období vedou ke zlepšení využitelnosti krmiv a v důsledku k vyšším přírůstkům.

Budoucnost ve vývoji krmných enzymů

Budoucí výzvy ve výzkumu a vývoji enzymů pro výživu zvířat jsou: 1) eliminace a rozklad antinutričních faktorů. Tyto substance často interferují s endogenními enzymy zvířete a snižují tak stravitelnost krmiva. 2) Zvýšení stravitelnosti škrobů, proteinů, nebo minerálů, které jsou buď pevně vázány na buněčné stěny nebo jiné sacharidové i nesacharidové komplexy a jsou pro trávicí systém zvířete nevyužitelné. Sem patří i vazba fosforu na kyselinu fytovou, která je pro většinu organismů nestravitelná. 3) Rozklad dalších specifických vazeb,

kteřé jsou jinak pro trávicí systém zvířete nerozložitelné. A tím uvolnit více živin. 4) Suplementace exogenních enzymů mladým zvířatům, jejichž trávicí aparát není ještě schopen tyto enzymy produkovat v adekvátním množství.

3.1. Celulasy (β -glukanasy)

Celulosa je spolu s hemicelulosou hlavní rostlinný strukturní polysacharid. Dohromady tvoří 70 % rostlinné biomasy (Ladisich *et al.*, 1983). V rostlině mají za úkol držet tvar orgánů, slouží jako zdroj energie herbivorům. Působením enzymů celulas a hemicelulas, které jsou obvykle mikrobiálního původu, se tyto polysacharidy mohou rozkládat na rozpustné cukry a sloužit jako zdroj energie. Mikroorganismy, tedy houby, bakterie a aktinomycey produkují tři komponenty celulasy: **endoglukanasy** (EC 3.2.1.4, 1,4- β -D-glukan hydrolasa), **exoglukanasy** a cellobiohydrolasy (tzv. CBHs) (EC 3.2.1.91, 1,4- β -D-glukan cellobiohydrolasa) a **β -glukosidasu** nebo-li celobiasu (EC 3.2.1.21, β -D-glukohydrolasa). Produkují je buď zvlášť, nebo jako komplex pro hydrolyzu celulosy.

Struktura celulosy

Stěny rostlinných buněk sestávají zejména z celulosy (40–45 %), hemicelulosy (30–35 %) a ligninu (20–23 %) (Ladisich *et al.*, 1983). Celulosa je lineární polymer glukosy, β -glukan tvořený molekulami glukosy spojenými lineární β -1,4-glykosidickou vazbou s jednoduchou primární a komplexní terciární strukturou. Jednotkou celulosy je disacharid celobiosa. Stupeň polymerizace je u celulosy od 500 do 14.000. (Marx-Figini a Schultz, 1966). Řetězce celulosy jsou vyrovnány paralelně. V některých oblastech jsou velmi těsně spojeny vodíkovým můstkem, což vede k tvorbě krystalů, v jiných amorfních regionech jsou naproti tomu jen volně. Stupeň krystalizace kolísá od 0–100 %, přičemž např. u bavlny se uvádí 70 % (Fan *et al.*, 1980). Krystalické regiony jsou velmi těžko přístupné celulase i kyselině, zatímco amorfní regiony jsou přístupny snadno a hydrolyzují i ve slabé kyselině např. v žaludku. Od toho se odvíjí stravitelnost celulosy.

Enzymologie celulas

Celulasy jsou produkovány širokým spektrem bakterií a hub, zahrnujícím aeroby, anaeroby, mezofilní i termofilní mikroorganismy. Aerobní bakterie a houby obvykle produkují

extracelulární celulasy a hemicelulasy. Anaerobní bakterie (*Clostridium thermocellum*, *C. cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Acetivibrio cellulolyticus*) a anaerobní houby (*Neocallimastix frontalis*, *N. patriciarum*, *Piromyces equi*) produkují enzymy ve formě multienzymových agregovaných komplexů, které jsou účinnější než enzymy těch aerobních mikroorganismů.

Většina dřívějších prací na celulolytických enzimech byla provedena na enzimech izolovaných z mezofilních hub *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* a *Trichoderma koningii* (Coughlan a Ljungdahl, 1988). V posledních třiceti letech bylo zjištěno, že i jiné mikroorganismy jako např. termofilní houby (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*), mezofilní anaerobní houby (*N. frontalis*, *N. patriciarum*, *P. communis*, *Sphaeromonas communis*, *P. equi*, *Orpinomyces* sp.), mezofilní a termofilní aerobní bakterie (např. *Cellulomonas fimi*, *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*, *Cellvibrio* sp., *Microbispora bispora*, *Clostridium cellulolyticum* a *C. cellulovorans*), mezofilní a termofilní anaerobní bakterie (*A. cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *C. thermocellum* a *C. stercorarium*), a aktinomycety (*Thermomonospora fusca*), produkují rovněž vysoce aktivní celulasové ale i hemicelulasové systémy (Bhat a Hazlewood, 2001). Významným objevem je to, že vybrané bakterie např. *Pyrococcus furiosus* a *Thermofilum* sp., které rostou při 85 a 110°C, produkují extrémně stabilní celulolytické a hemicelulolytické enzymy (Antranikian, 1994; Winterhalter a Liebl, 1995).

Tab. 6: Přehled aktivit xylanas a celulas

Enzym	Aktivita
Endoglukanasa - endocelulasa (1,4-β-D-glucan glucanohydrolasa; EC 3.2.1.4)	-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G- ↑ ↑ přerušuje 1,4-β vazby na náhodných místech
Cellobiohydrolasa (CBH) - exocelulasa (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolasa; EC 3.2.1.91)	G-G-G-G-G-G-G-G-G-G- ↑ (typ I) ↑ (typ II) uvolňuje celobiosu z redukujícího (typ II) a neredukujícího (typ I) konce
Exoglukanasa - glukohydrolasa (1,4-β-D-glucan glucohydrolase; EC 3.2.1.74)	G-G-G-G-G-G-G-G-G-G- ↑ uvolňuje glukosu z neredukujícího konce

jsou jedněmi z častých heteropolymerů obsažených v rostlinách, které se patří do hemicelulosity. Arabinoxylany jsou tvořeny řetězcem β -1,4 spojených xylosových jednotek, z nichž mnohé jsou substituovány v poloze 2, 3 nebo 2,3- arabinosou. Arabinoxylan je široce zastoupen například v endospermu pšenice, kde tvoří 2–5 % hmotnosti semene. Dvě třetiny pšeničného arabinoxylanu jsou ve vodě nerozpustné (McCleary, 2001). Přesto, obě složky, jak ve vodě rozpustná, tak i nerozpustná, mají vysokou kapacitu absorbovat vodu, až desetinásobek své hmotnosti, což znamená, že arabinoxylany přispívají k viskozitě tráveniny a způsobují v krmivech stejné problémy jako β -glukany.

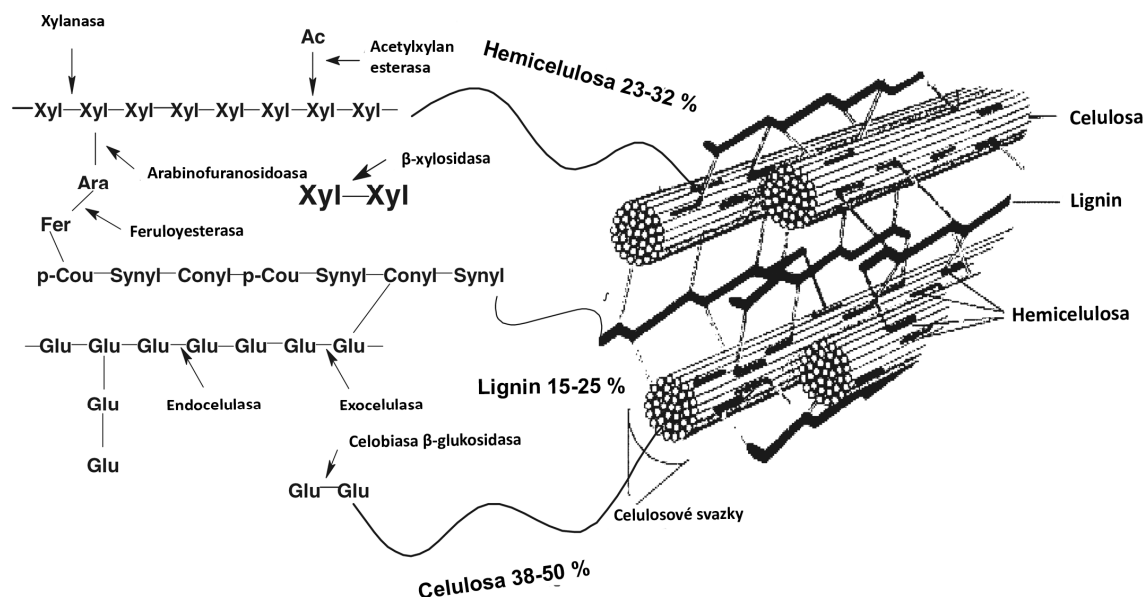
Vzhledem ke své heterogenitě si žádá štěpení hemicelulosity komplexní enzymatický aparát, zahrnující *endoxylanasy*, nebo-li xylanasy (EC 3.2.1.8) a *endomananasy* nebo také β -mananasy (EC 3.2.1.78, 1,4- β -D-manan mananohydrolasa), které rozštěpí páteřní strukturu. Ostatní hemicelulasy, včetně β -xylosidasy, β -mannosidasy, α -L-arabinofuranosidasy, α -D-glukuronidasy, α -galaktosidasy, acetylerasy a fenyl esterasy odstraní vedlejší řetězce a funkční skupiny.

Na rozdíl od celulosity může být hemicelulosa frakce extrahována zásaditým vodným roztokem. V závislosti na cukerných zbytcích navěšených na páteřní strukturu molekuly, může být hemicelulosa klasifikována jako xylan, glukomanan, galaktan nebo arabinan, přičemž první dva zmíněné jsou nejrozšířenější. Xylany z jednoletých rostlin jsou více heterogenní než xylany z vytrvalých rostlin. Arabinoxylany jsou různě větvené, u trav vázány na kyselinu octovou a fenolické kyseliny – ferulovou a *p*-kumarovou.

V pletivech rostlin je celulosa často obalena a propojena s hemicelulosou a ligninem, vytvářející dohromady skelet buněk, tzv. lignocelulosu. Fyzicky, rozklad tohoto komplexu není možný bez koktejlu celulas a hemicelulas (Obr. 1).

Enzymologie xylanasy

Hemicelulasy jsou obvykle bakteriemi produkovány ve směsi s celulasami jako součást komplexu pro rozklad celulosity a xylanasy. Mikroorganismy produkující aktivní a využitelné komplexy xylanasy a celulas jsou zmíněny v předešlé kapitole. Mimo ně, *Aspergillus* sp. a *Cryptococcus* sp. produkují v rámci komplexu xylanasy a vysoce potentní tzv. „xylan debranching enzymes“, které jsou, společně s hydrolysou hlavního řetězce, schopny navíc z postranních řetězců uvolňovat arabinosu (Coughlan a Hazlewood, 1993; Viikari *et al.*, 1993).



Obr. 1. Lignocelulosa: v rostlinných pletivech, kombinace ligninu a hemicelulosity tvoří ochranný štít celulosy jako bariéru proti enzymatické degradaci (upraveno z Khandeparker a Numan, 2008)

Substrátová specificita

Xylanasy jsou obvykle specifické pro vnitřní β -1,4 vazby polymerního xylanu. V závislosti na tom, jakou frakci hemicelulosity štěpí, jsou klasifikovány jako specifické a nespecifické. Specifické xylanasy jsou aktivní v rozkladu xylanů s β -1,4 vazbami, zatímco ty nespecifické jsou schopny hydrolyzovat jakékoliv β -1,4 polymery, například CM-celulosu (Bhat a Hazlewood, 2001). Aktivity jednotlivých xylanas jsou uvedeny v Tab. 6.

3.3. Fytasy

Kyselina fytová v krmivech

Většina fosforu je v rostlinách uložena ve formě fytátové vazby. Neschopnost zvířat trávit tuto vazbu prodražuje cenu krmiv a vede ke zvýšení environmentální zátěže z živočišné produkce. Vývoj a výzkum v oblasti fytas vede k vývoji enzymů schopných rychle a účinně fytát uvolňovat a použití fytas je standardní, praktickou a efektivní metodou při formulaci směsí.

Kyselina fytová je strukturně tvořena myo-inositolovým cyklem. Molekula snadno tvoří komplexy s multivalentními kationty. Cheryan (1980) uvádí, že pořadí tvorby stabilních komplexů je v pořadí $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2+} > Fe^{2+}$. Kovy se váží vždy na jeden fosfát a vytváří můstky mezi dvěma molekulami, vedoucí ke vzniku těžko stravitelných komplexů při neutrálním a zásaditém pH. Při nízkých pH snižuje částečná protonace molekuly komplexaci s minerály a tedy tvorbu nerozpustných sraženin. Struktura kyseliny fytové je tedy velmi variabilní a závislá na množství minerálů a pH krmiva.

Kyselina fytová v rostlinách slouží jako rezervoár fosforu. Obiloviny (pšenice, kukuřice, ječmen) a zrnité leguminózy (hrách, cizrna) mají podobné obsahy fytátu, kolem 0,25 % v sušině. Olejníky mají obsah fytátu vyšší, např. sója 0,39 % řepkové výlisky 0,70 %, bavlníkový šrot (0,84 %), slunečnicové výlisky 0,89 %. V průměru je fytát v biomase zastoupen v 70 % z celkového fosforu (Maenz, 2001).

Nejčastější fytátové komplexy v rostlinách jsou komplexy K^+ a Mg^{2+} , v menším množství Ca^{2+} , tzv. fytin. Fytin je součástí globoidních krystalů, které jsou součástí proteinů vázaných na membrány. Velikost krystalů je závislá na množství poměru monovalentních a divalentních iontů. Při vyšším poměru divalentních iontů stoupá jejich velikost. Naopak relativně dobrá stravitelnost fytátu ze sóji a hrachu je dána vysokým množstvím vázaného monovalentního draslíku, kdy krystaly jsou menší a lépe stravitelné v trávicím traktu zvířat (Lott a Ockdenken, 1986). U každé plodiny je fytát deponován v jiném pletivu. U pšenice a rýže je nejvíce nacházen v aleuronové vrstvě, u kukuřice naopak v endospermu (Maenz, 2001). Vliv na stravitelnost fytinu má dále vliv jeho lokalizace, tedy pletivo, kterým je obklopen. Například pokud bude ve sklovitém celulosovém obalu semene, bude hůře stravitelný než v klíčku semene. Právě tvorba komplexů ho činí těžko přijatelným, např. fosfor z fytátu, který je do krmiv přidán ve formě čisté kyseliny nebo sodné soli je totiž stravitelný téměř stejně dobře jako fosfor z dikalcium fosfátu (Harms *et al.*, 1962).

Nestrávená kyselina fytová má vliv na dostupnost a stravitelnost minerálů, zejména těch, se kterými tvoří silné komplexy, zejména Zn a Cu. V neutrálním prostředí střeva tedy zůstává značná část minerálů vázána na fytátový komplex. Chelátory jako EDTA mohou kompetitivně s fytovou kyselinou vázat např. Zn ve střevě, zabraňovat jeho komplexaci a zvyšovat jeho bioavailabilitu. Mezi další látky s touto vlastností patří pektiny a kyselina askorbová, které např. zvyšovaly bioavailabilitu železa u vegetariánů, resp. kojeneckých mléčných sójových náhražek (Anand a Seshadri, 1995; Davidsson *et al.*, 1994).

Je známo, že fytová kyselina snižuje stravitelnost proteinu a absorpci aminokyselin. Byla prokázána negativní korelace obsahu fytátu a stravitelnosti u sóji. Kompletní defytinace sóji nebo kukuřice vedla ke zvýšení stravitelnosti bílkovin v těchto krmivech o 12–29 % (Zyla *et al.*, 1995). Nabité fosfátové skupiny fytinu mají schopnost interreagovat s aminokyselinami a vázat volné skupiny argininu a lyzinu na molekule proteinu. Navíc, multivalentní kovy v komplexech s fytátem dále váží v proteinu karboxylové skupiny aspartátu a glutamátu (Cheryan, 1980) a to nejen proteinu z krmiva, ale tímto mechanismem mohou snižovat funkci celé řady trávicích enzymů. Je známa a popsána např. inhibice trypsinu v podmínkách *in vitro* (Caldwell, 1992).

Stravitelnost fytátu

Při formulaci krmiv, 30 % fytátu je v průměru považováno za stravitelné a zbytek je přidáván v minerální formě. Zbýlých sedmdesát procent je tedy nepřijatelných, což je velmi nepřesný odhad. Procento stravitelného fytátu variuje od 0 do 60 %. Nelson (1976) stanovil, že přístupnost fytátu u kukuřičné diety byla 0 %, zatímco u pšeničné 8 %. Ballam *et al.* (1984) zjistil variabilní 3–48 % využitelnost fytátového fosforu. Je zřejmé, že záležitost je komplexní, závisí na pH, složení, obsahu a speciaci prvků v materiálu a lokalizaci fytátu v pletivech.

Tabulka 7 ukazuje přístupnost fosforu z hlavních složek krmiv. Relativně vysoká přístupnost fosforu z pšenice a ze žita je dána vlastní vysokou fytasovou aktivitou těchto krmiv, kdy v pšenici bylo zjištěno 1193 U/kg krmiva a u ječmene 582 U/kg. Vyšší aktivita je známa už jen u pšeničných otrub (2957 U/kg). U ostatních krmiv v tabulce je fytasová aktivita výrazně menší, pod 60 U/kg a tedy nevýznamná (Eeckhout a De Pepe, 1994).

Tab. 7: Přístupnost fosforu

	Fytátový P z celkového P (%)	Přístupnost P pro prasata (%)	Nefytátový P pro drůbež (%)
Obiloviny			
Kukuřice	72	12	28
Oves	67	23	33
Ječmen	64	31	36
Tritikale	-	46	33

	Fytátový P z celkového P (%)	Přístupnost P pro prasata (%)	Nefytátový P pro drůbež (%)
Pšenice	69	50	31
Proteinová krmiva			
Řepkový šrot	59	21	26
Sójový šrot	60	25	35
Podzemnicový šrot	80	12	21

(Kornegay, 2001)

Fytasová aktivita

Fytasy jsou specifické fosfatasy, které jsou produkovány mikroorganismy a rostlinami. V malé míře i živočichy, avšak malá fytasová aktivita detekovaná ve střevě živočichů má vliv na využití fytátového fosforu pravděpodobně zanedbatelný (Maenz, 2001).

Fytasy jsou klasifikovány do dvou kategorií: 3-fytasy a 6-fytasy. Tato klasifikace odkazuje na počáteční místo hydrolýzy fytinu. 6-Fytasy jsou často přítomny v rostlinách, zatímco 3-fytasy jsou obvykle přítomny v mikroskopických houbách. Hydrolýza fytátu není zcela prozkoumána, ale má se za to, že jeden enzym není schopen defosforylovat fytát na myoinositol a že se na této funkci podílí nespécifické fosfatasy. Dvorakova (1998) uvádí, že fytasová aktivita byla zjištěna u 29 druhů mikroorganismů, z toho 21 produkovalo extracelulární fytasu. Nejsilnější a dosud nejlépe prozkoumána je aktivita fytasy z *Aspergillus niger*, na jehož genu je založena většina dnes komerčně produkováne mikrobiální fytasy (Maenz, 2001). Při overexpresi genu v mikroorganismu nastávají problémy se zdroji a přísunem anorganického fosforu. Extracelulární fytasy, např. z *Bacillus* sp. jsou středně tepelně odolné s teplotním oknem aktivity do kolem 60°C a denurací enzymu kolem 70°C (Fu *et al.*, 2008; Ullah a Gibson, 1987). Perspektivní se jeví výzkum termostabilní fytasy z *Aspergillus fumigatus*, která je aktivní 20 min při 100°C a 120 min při 90°C. (Wang *et al.*, 2007; Pasamontes *et al.*, 1997), případně fytasy z *Neurospora crassa*, která je dostatečně stabilní při 80°C při teplotním optimu kolem 60°C a pH optimu pH 3,5. (Zhou *et al.*, 2006).

Fytasa jako aditivum

Ravindaran *et al.* (1995) ve své meta analýze literatury uvádí, že přidavek fytasy do krmiv zvyšuje u drůbeže přístupnost fosforu v rozsahu 20–45 %. Podobý rozsah byl pozorován u prasat ve výkrmu krmených směsí na bázi ječmene a sóji bylo vstřebání fosforu zvýšeno o

40 % (Nasi a Helander, 1994). Lei *et al.* (1993) rovněž pozoroval 43% snížení P ve výkalech po suplementaci fosfatasy. Bruce a Sundstol (1995) zjistili zvýšení ileální stravitelnosti fosforu u prasat v rozmezí 20–27 % oproti kontrole bez fytasy u prasat ve výkrmu s dietou na bázi ječmene. Účinnost fosfatasy se rapidně snižuje se zvyšujícím se poměrem C : P (Maenz, 2001). Přídavek fytas má malý ale zřejmý efekt na zvýšení stravitelnost proteinu u prasat a drůbeže (Ravindran *et al.*, 1995).

Qian *et al.* (1996) stanovil, že 652–963 U fytasy na kg krmiva bylo u nosnic ekvivalentní 1 g nefytátového fosforu, přičemž horní mez je pro krmiva s vyšším obsahem nefytátového fosforu (0,36%). Yi *et al.* (1996) uvádí podobný poměr, kdy 1146 a 785 jednotek fytasy nahradilo 1g nefytátového fosforu u směsí na bázi sóji, resp. směsi kukuřice-sóji u prasat. Doporučené dávkování je kolem 500 jednotek/g fosforu. Dalo by se spekulovat, že přídavek fytasy je méně efektivní u např. diet založených na pšenici, která má z obilovin poměrně vysokou vnitřní fytasovou aktivitu (Maenz, 2001).

Defytinace krmiv před podáváním

Úlohou fytátových vazeb v rostlinách je imobilizace a skladování fosforu po dobu vegetačního klidu. V době klíčení nebo růstu naopak fytasy v semeni tento fosfor uvolňují. Klíčení tedy zvyšuje aktivitu přirozeně se vyskytujících fytas. I prosté namáčení krmiva před zkrmením snižuje podíl fytátového fosforu (Maenz, 2001). Dalším postupem je možnost inokulace materiálu mikroorganismem produkujícím extracelulární fytasu. Například inokulace řepkových výlisků mikroskopickou houbou *Aspergillus ficuum* vedla k rychlému vzestupu fytasové aktivity v krmivu, potažmo lineárnímu snížení fytové kyseliny a kompletní eliminaci fytátu po 144 hodinách skladování (Nair *et al.*, 1991). Předpokládá se, že celý proces může být urychlen přidavky aditiv, jako jsou surfaktanty, glukosa nebo organické kyseliny. Kompletní defytinizace řepky byla v jiném experimentu dosažena již po 48 hodinách (Al-Ashed a Duvnjak, 1994). Defytinizace sójového a kukuřičného šrotu z 81 % bylo po předchozím přidavku kyseliny citronové a následně po dvou hodinách fytátu, dosaženo již po 4 hodinách (Zyla *et al.*, 1995). Defytinace krmiv na komerční bázi má spoustu nevýhod a není běžně používána. Jenou z příčin jsou například náklady na následné sušení krmiva, které nejsou vyváženy vyšším obsahem fosforu.

4. Specifika použití enzymů pro jednotlivé kategorie zvířat

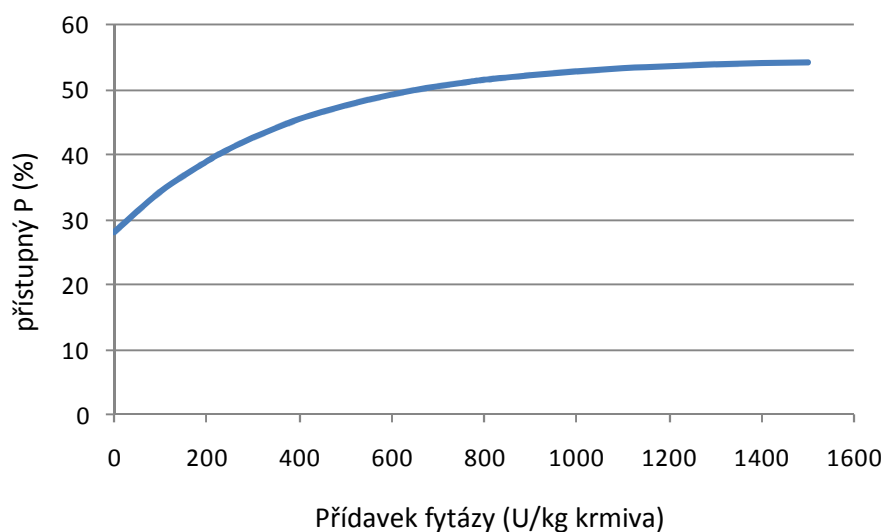
4.1. Fytasa v chovech drůbeže, prasat a akvakultuře

Fytasa významně zvyšuje přístupnost P z rostlin obsahujících velké procento fytátu. Vzhledem k tomu, že fytát komplexuje s Zn, Cu, Ca a dalšími prvky, zejména dvojmocnými, zlepšuje fytasa i přístupnost těchto prvků. V neposlední řadě zvyšuje stravitelnost proteinů, neboť fytasa částečně znepřístupňuje ve střevě protein vazbou na aminokyseliny, jak bylo popsáno výše.

Přídavek fytasy prasatům a drůbeži má exponenciální průběh. Při přídavku 500 U /kg krmiva se zvýší stravitelnost celkového fosforu o ca. 20 % (Obr. 2). Exponenciální průběh křivky v důsledku znamená, že přídavek 500 U/kg směsi vedlo k zvýšení o 7,8 % (Kornegay, 2001). Nitrayová *et al.* (2009) zjistila u kanylovaných prasat, že přídavek mikrobiální fytasy do bazální diety zlepšil celkovou a ileální stravitelnost P a Ca o 30, resp. 60% (3 000 U/kg) a o 20–40 % při 1 000 U/kg. Přídavek fytasy lze tedy vyjádřit jako ekvivalent P. U prasat se při formulaci krmiv počítá s poměrem, že 500 U fytasy/kg krmiva je ekvivalent 1g P. Tato hodnota byla stanovena na základě hodnocení přírůstku, mineralizace kostí a stravitelnosti P. U brojlerů je tomu podobně (400 U/g zadržného P) (Kornegay, 2001). Podobně přídavek fytasy zvyšuje přístupnost vápníku, ovšem liberace Ca u plodin s vysokým obsahem Ca zase snižuje uvolňování P a tyto prvky vůči aktivitě fytasy působí kompetitivně. Uvádí se, že 500 U fytasy/kg krmiva u brojlerů bylo ekvivalentní 0,37 g Ca. V jiných studiích bylo toto množství ekvivalentní 0,87 g Ca (Kornegay *et al.*, 1996; Quian *et al.*, 1996). U prasat se počítá na 500 U fytasy/kg krmiva s 0,4–0,7 stráveného Ca (Kornegay *et al.*, 2001). Použití mikrobiální fytasy pro prasata a drůbež je tedy velmi efektivní, zejména pokud je krmná směs založena na vysokém podílu plodin s nízkou fytasovou aktivitou. Efektivita fytasy závisí tedy, jak již bylo řečeno, na mnoha faktorech.

Vedle chovů prasat a drůbeže nachází fytasa uplatnění v intenzivních chovech ryb. Podobně jako u prasat a drůbeže, se předpokládá, že ryby jsou schopny strávit pouze 30 % celkového fosforu a přídavek anorganického fosforu je nezbytný k zachování produkční potřeby. Publikované výsledky výzkumu ukazují, že suplementace fytasy snižuje P exkreci o 30–88 %.

Dále je známo, že činnost fytas stoupá v kyselém prostředí a přidavek 1% kyseliny octové nebo citronové vedl k vyšší účinnosti (Kornegay, 2001).



Obr. 2: Trend vlivu přídavku fytasy na celkovou přístupnost fosforu u prasat (Kornegay, 2001)

4.2. Celulasy a hemicelulasy u prasat a drůbeže

Prasata mají oproti drůbeži několik zásadních odlišností, které determinují vliv enzymů v gastro intestinálním traktu. Pasáž tráveniny od žaludku na konec tenkého střeva je u brojlerů ca. 4 hodiny, u prasat se uvádí až 7,5 (Partridge, 2001). Delší doba znamená více času pro efektivní vstřebání živin. Mimo to, prasata mají tráveninu řidší než drůbež, zhruba desetkrát, což eliminuje negativní efekt viskózních obilovin, ječmene a pšenice. Prasata tedy budou profitovat z účinku xylanas ve formě vyššího přísunu energie a β -glukanas, snižujících viskozitu tráveniny. Efekt snížení viskozity ale nebude tak zásadní jako ve výživě drůbeže. Obě skupiny zvířat mají společné to, že neprodukují endogenní enzymy schopné rozrušit řetězce β -glukanů a tedy v jisté míře jsou oba ovlivněny jejich negativním efektem. Bylo zjištěno, že např. u prasat vede vyšší příjem rozpustné vlákniny ke změnám mikrobiálního složení trávicího traktu. Excelentní review na vliv suplementace enzymů ve výživě prasat zpracoval Partridge (2001).

Pšenice, tritikale a žito obsahují v endospermu a aleuronové vrstvě zejména arabinoxylany, a β -glukan je zastoupen jen v malé míře. Arabinoxylany endospermu jsou obvykle rozpustné ve vodě v závislosti na varietě nebo odrůdě, zatímco arabinoxylany obsažené v tlustých buněčných stěnách přítomných v aleuronové vrstvě semene jsou obvykle nerozpustné. Proto, xylanasy budou hlavní enzymy používané pro tento typ obilovin. Pšenice a oves, narozdíl od nich obsahují β -glukany a mohou být ve formulaci krmiv kombinovány s přídatkem β -glukanas. Xylanasy mají potenciál pozvednout využitelnost surovin o nízké kvalitě na kvalitu dobrou.

5. Závěr

Enzymy pro využití ve výživě zvířat jsou systematicky vyvíjeny od 80. let. Fytasy, xylanasy a β -glukanasy se systematicky využívají v chovech drůbeže, prasat, dokonce i akvakultuře a začínají se prosazovat i do výživy přežvýkavců. Celosvětově se odhaduje, že se krmné enzymy používají v 65 % chovů brojlerů, v Evropě pak v 80 % chovů brojlerů a v 10 % chovů prasat. Fytasy zvyšují přístupnost P, Ca, Zn, stravitelnost bílkovin a tuků. Je dobře popsán vliv na životní prostředí, kdy enzymy významně snižují obsah P a N ve výkalech. Je známo, že enzymy ve výsledku vedou k zmenšování velikosti trávicího traktu, kdy více živin je využito pro produkci. Využití enzymů vede k vyrovnanější produkci v podniku bez ohledu na variabilní kvalitu krmiv a obsahy některých antinutričních látek v nich. Transgenní mikroorganismy umožňují produkci vysoce kvalitních termostabilních rekombinantních enzymů s pomocí GRAS mikroorganismů. Současné komerčně dostupné enzymy jsou termostabilní při teplotách i kolem 90°C. Přesto, další výzkum v oblasti je nutný zejména pro vývoj testů efektivity enzymů in vitro, jejich skladovatelnosti, rezistenci v trávicím traktu vůči endogenním enzymům a kyselinám. Důraz musí být kladen na schvalovací proces především s ohledem na bezpečnost rekombinantních enzymů.

Reference

- Anand, A.N., Seshadri, S. (1995) A quantitative model for prediction of iron bioavailability from Indian meals: an experimental study. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 46, 335–342.
- Antranikian, G. (1994) Extreme thermophilic and hyperthermophilic microorganisms and their enzymes. *Advanced Workshops in Biotechnology on 'Extremophilic Microorganisms'*, NTUA, Athens, Greece, pp. 1–30.
- Arendarčík J (1986) Fyziológia, In: *Veterinárska medicína a farmakologie* (J. Vodrážka, ed.), Osveta, p. 35–65.
- Armstrong, M.J., Carey, M.C. (1982) The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *Journal of Lipid Research* 23, 70–80.
- Ballam, G.C., Nelson, T.S., Kirby, L.K. (1984) Effect of fiber and phytate source and of calcium and phosphorus level on phytate hydrolysis in the chick. *Poultry Science* 63, 333–338.
- Baron, S.F., Hylemon, P.B. (1996) Biotransformation of bile acids, cholesterol, and steroid hormones. In: Mackie, R.I., White, B.A. (Eds.) *Gastrointestinal Microbiology, Vol.1: Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*, Chapman and Hall, London, pp. 470–510.
- Bedford, M.R., Apajalahti, J. (2001) Microbial interactions in the response to exogenous enzyme utilization. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.) *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI International. pp. 299–314.
- Bedford, M.R., Classen, H.L. (1992) Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *Journal of Nutrition* 122, 560–569.
- Bhat, M.K., Hazlewood, G.P. (2001) Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.) *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI International. pp. 11–60.

- Bilgili, S.F., Montenegro, G.I., Hess, J.B., Eckman, M.K. (1999) Sand as litter for rearing broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research* 8, 345–341.
- Binder, H.J., Filburn, B., Floch, M. (1975) Bile acid inhibition of intestinal anaerobic organisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 28, 119–125.
- Bruce, J.A.M., Sundstol, F. (1995) The effect of microbial phytase in diets of pigs on apparent ileal and faecal digestibility, pH and flow of digesta measurements in growing pigs fed a high-fibre diet. *Canadian Journal of Animal Science* 75, 121–127.
- Brufau, J., Francesch, M., Pérez-Vendrell, A.M. (2006). The use of enzymes to improve cereal diets for animal feeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 1705–1713.
- Caldwell, R.A. (1992) Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40, 43–46.
- Classen, H.I., Scott, T.A., Irish, G.G., Huck, P., Swift, P., Bedford, M.R. (1995) The relationship of chemical and physical measurements to the apparent metabolisable energy (AME) of wheat when fed to broiler chickens with and without a wheat enzyme source. *Proceeding of the 2nd European Symposium on Feed Enzymes, Antalya, Turkey*, 65–69.
- Cotta, M.A., Russell, J.B. (1996) Digestion of nitrogen in the rumen: a model for metabolism of nitrogen compounds in gastrointestinal environments. In: Mackie, R.I., White, B.A. (Eds.) *Gastrointestinal Microbiology, Vol.1: Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. Chapman and Hall, London, pp. 380–423.
- Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P. (1993) *Hemicellulose and Hemicellulases*. Portland Press, London, pp. 152.
- Coughlan, P., Ljungdahl, G. (1988) Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. In: Aubert, J.P., Btguin, P., Millet, J. (Eds.) *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, FEMS Symposium no. 43*, pp. 11–30. London & San Diego: Academic Press.
- Davidsson, L., Galan, P., Kastenmayer, P., Cherouvrier, F., Juillerat, M.A., Hercberg, S., Hurrell, R.F. (1994) Iron bioavailability studied in infants: the influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. *Pediatric Research* 36, 816–822.
- Dvorakova, J. (1998) Phytase: sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiologica* 43, 323–338.

- Eeckhout, W., De Paepe, M. (1994). Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 47, 19–29.
- Fan, L.T., Lee, Y.-H., Beardmore, D.H. (1980) Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. In: Fiechter, A. (Ed.) *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 14. Springer-Verlag, Berlin, pp. 101–117.
- Forsberg, C.W., Cheng, K.J., White, B.A. (1996) Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: Mackie, R.I., White, B.A. (Eds.) *Gastrointestinal Microbiology*, Vol.1: *Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. Chapman and Hall, London, 319–379.
- Fu, S.J., Sun, J.Y., Qian, L.C., Li Z.Y. (2008) *Bacillus* phytases: Present scenario and future perspectives. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151, 1–8.
- Godfrey, T., West, S.I. (1996) Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey, T. and West, S.I. (Eds.) *Industrial Enzymology*, 2nd edn. Macmillan, UK, pp. 1–8.
- Harms, R.H., Waldroup, P.W., Shirley, R.L., Ammerman, C.B. (1962) Availability of phytic acid phosphorus for chick. *Poultry Science* 63, 1189–1191.
- Hock, E., Halle, I., Matthes, S., Jeroh, H. (1997) Investigation on the composition of the ileal and caecal microflora of broiler chicks in consideration to dietary enzyme preparation and zinc bacitracin in wheat-based diets. *Agrobiological Research – Zeitschrift für Agrabiologie Agrikulturchemie Ökologie* 50, 85–95.
- Champ, M., Szylił, O., Raibaud, P., Ait-Abdekader, N. (1983) Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *Journal of Applied Bacteriology* 55, 487–493.
- Cheryan, M. (1980) Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13, 297–335.
- Choct, M., Hughes, R.J., Bedford, M.R. (1999) Effect of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileal and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *British Poultry Science* 40, 419–422.
- Khandeparker, R., Numan, M. T. (2008). Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 635–644.
- Kornegay, E.T. (1996) Effectiveness of Natuphos phytase in improving the bioavailability of phosphorus and other nutrients in corn–soybean meal diets for young pigs. In: Coelho, M.B. and Kornegay, E.T. (Eds.) *Phytase in Animal Nutrition and Waste Management*. BASF Corporation, Mount Olive, New Jersey, pp. 249–258.

- Ladisch, M.R., Lin, K.W., Voloch, M., Tsao, G.T. (1983) Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microbial Technology* 5, 82–100.
- Larbier, M., Leclercq, B. (1994) Nutrition and feeding of poultry. Nottingham University Press, Nottingham, 305 p.
- Lee, S.S., Kun, Ch., Ha, J.K., Moon, Y.H., Cho, N.J. (2002) Distribution and activities of hydrolytic enzymes in the rumen compartments of Hereford bulls fed alfalfa based diet. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences* 15, 1725–1731.
- Lei, X.G., Ku, P.K., Miller, E.R., Yokoyama, M.T. (1993) Supplementing corn–soybean meal diets with microbial phytase linearly improves phytate phosphorus utilization by weanling pigs. *Journal of Animal Science* 71, 3359–3367.
- Lott, J.N.A., Ockenden, I. (1986) The fine structure of phytate-rich particles in plants. In: Graf, E. (Ed.) *Phytic Acid Chemistry and Applications*. Pilatus Press, Minneapolis, pp. 43–55.
- Mackie, R.I. (1996) Gut environment and evolution of mutualistic fermentative digestion. In: Mackie R.I., White, B.A. (Eds.) *Gastrointestinal Microbiology, Vol.1: Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. Chapman and Hall, London, pp. 13–35.
- Maenz, D.D. (2001) Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.) *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI International, pp. 61–77.
- Marounek, M., Březina, P., Šimůnek, J. (2003) *Fyziologie a hygiena výživy (Druhé, doplněné vydání)*, Vysoká vojenská škola pozemního vojska ve Vyškově, Fakulta ekonomiky obrany státu a logistiky, P.č.t.:S 10573. 147s.
- Marounek, M., Vovk, S.J., Skřivanová, V. (1995) Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition* 73, 463–469.
- Marquardt, R.R., Brufau, J. (1997) Future of feed enzymes: Orientation and perspective. In: Morand-Fehr P. (Ed.) *Feed manufacturing in Southern Europe: New challenges* Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, 1997. 209 p. (Cahiers Options Méditerranéennes ; v. 26). Proceedings from the South European Feed Manufacturers Conference, 1996/05/09-11, Reus (Spain).
- Marx-Figini, M. and Schultz, G.V. (1966) Zur biosynthese der cellulose. *Naturwissenschaften* 53, 466–474.
- McCleary, B.V. (2001) Analysis of feed enzymes. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.) *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI International, pp. 85–108.

- Moran, E.T., McGinnis, J. (1968) Growth of chicks and turkey poults fed western barley and corn-based rations: effect of autoclaving on supplemental enzyme requirement and asymmetry of antibiotic response between grains. *Poultry Science* 47, 152–158.
- Morishita, T.Y., Lam, K.M., McCapes, R.H. (1992) The microbiologic ecology of the turkey poult jejunum. *Preventive Veterinary Medicine* 14, 233–240.
- Morrison, M., Mackie, R.I. (1996) Biosynthesis of nitrogen-containing compounds. In: Mackie, R.I., White, B.A. (Eds.) *Gastrointestinal Microbiology, Vol.1: Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. Chapman and Hall, London, pp. 424–469.
- Nair, V.C., Laflamme, J., Duvnjak, Z. (1991) Production of phytase by *Aspergillus ficuum* and reduction of phytic acid content in canola meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54, 355–365.
- Nasi, M., Helander, E. (1994) Effects of microbial phytase supplementation and soaking of barley–soybean meal on availability of plant phosphorus for growing pigs. *Acta Agriculture Scandinavica Section A, Animal Science* 44, 79–86.
- Nelson, T.S. (1976) The hydrolysis of phytate phosphorus by chicks and laying hens. *Poultry Science* 55, 2262–2264.
- Nitrayová, S., Patráš, P., Brestenský, M., Zelenka, J., Brož, J., Heger, J. (2009). Effect of microbial phytase and diet fermentation on leal and total tract digestibility of nutrients and energy in growing pigs. *Czech Journal of Animal Science*, 54, 163–174.
- Noy, Y., Sklan, D. (1994) Digestion and absorption in the young chick. *Poultry Science*, 366–373.
- Parker, J., Oviedo-Rondón, E., O., Clack, B.A., Clemente-Hernández, S., Osborne, J., Remus, J.C., Kettunen, H., Makivuokko, H., Pierson, E.M. (2007) Enzymes as feed additive to aid in responses against *Eimeria* species in coccidia-vaccinated broilers fed corn-soybean meal diets with different protein levels. *Poultry Science* 86, 643–653.
- Partridge, G.G. (2001) The role and efficacy of carbohydrase enzymes in pig nutrition. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.) *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI International, pp. 161–198.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., Van Loon, A.P.G.M. (1997) Gene cloning, purification and characterization of a heat-stable phytase from fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1696–1700.

- Qian, H., Kornegay, E.T., Denbow, D.M. (1996) Phosphorus equivalence of microbial phytase in turkey diets as influenced by calcium to phosphorus ratios and phosphorus levels. *Poultry Science* 75, 69–81.
- Ramsay, A.G., Scott, K.P., Martin, C.M., Rincon, M.T., Flint, H.J. (2006) Cell-associated α -amylases of butyrate-producing Firmicute bacteria from the human colon. *Microbiology* 152, 3281–3290.
- Ravindran, V., Bryden, W.L., Kornegay, E.T. (1995) Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poultry and Avian Biology Reviews* 6, 125–143.
- Reece, W.O. (1998) *Fyziologie domácích zvířat*, Grada, 449 p.
- Schutte, J.B., Langhout, D.J. (1999) Influence of the intestinal microflora on health and performance of broiler chicks. *Proceeding of the WSPA Spring Meeting, Scarborough, 22-24 March*, 57–58.
- Sheppy (2001) The current feed enzyme market and likely trends. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.) *Enzymes in farm animal nutrition*. CABI International, pp. 1–10.
- Silva, S.S.P., Smithard, R.R. (1996) Exogenous enzymes in broiler diets: crypt cell proliferation, digesta viscosity, short chain fatty acids and xylanase in the jejunum. *British Poultry Science* 37, pp. 77–79.
- Silvi, S., Rumney, C.J., Cresci, A., Rowland, I.R. (1999). Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from italian and UK donors. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 521–530.
- Sousa, T., Paterson, R., Moore, V., Carlsson, A., Abrahamsson B., Basit, A.W. (2008) The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 363, 1–25.
- Ullah, A.H.J., Gibson, D.M. (1987) Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Preparative Biochemistry* 17, 63–91.
- Vahjen, W., Glaser, K., Shafer, K., Simon, O. (1998) Influence of xylanase-supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. *Journal of Agricultural Sciences* 130, 489–500.
- Viikari, L., Tenkanen, M., Buchert, J., Ratto, M., Bailey, M., Siika-Apo, M., Linko, M. (1993) Hemicellulases for industrial applications. In: Saddler, J.N. (Ed.)

- Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues. CABI International, Wallingford, UK, pp. 131–182.
- Wagner, D.D., Thomas, O.P. (1987) Influence of diets containing rye or pectin on the intestinal flora of chicks. *Poultry Science* 57, 971–975.
- Wang, Y., Gao, X.R., Su, Q., Wu, W., An, L. (2007) Cloning, expression, and enzyme characterization of an acid heat-stable phytase from *Aspergillus fumigatus* WY-2. *Current Microbiology* 55, 65-70.
- White, W.B., Bird, H.R., Sunde, M.L., Marlett, J.A., Prentice, N.A., Burger, W.C. (1983). Viscosity of β -D-glucan as a factor in the enzymatic improvement of barley for chicks. *Poultry Science* 62, 853–862.
- Winterhalter, C., Liebl, W. (1995) Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1810–1815.
- Wyatt, C.I., Bedford, M.R., Waldron, I.A. (1999) Role of enzymes in reducing variability in nutritive value of maize using the ileal digestibility method. *Proceeding of the Australian Poultry Science Symposium* 11, 108–111.
- Yanke, L.J., Bae, H.D., Selinger, L.B., Cheng, K.J. (1998) Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* 144, 1565–1573.
- Yi, Z., Kornegay, E.T., Ravindran, V., Denbow, D.M. (1996) Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase. *Poultry Science* 75, 240–249.
- Zhou XL, Shen W, Zhuge J, Wang ZX. (2006) Biochemical properties of a thermostable phytase from *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiology Letters* 25, 61–66.
- Zyla, K., Ledoux, D.R., Garcia, A., Veum, T.L. (1995) An in vitro procedure for studying enzymic dephosphorylation of phytate in maize–soyabean feeds for turkey poults. *British Journal of Nutrition* 74, 3–17.

Vydal: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

Název: Enzymy ve výživě hospodářských zvířat

Autoři: Prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.
Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.
Česká zemědělská univerzita v Praze

Stanovisko: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

ISBN **978-80-7403-065-9**

Vydáno bez jazykové úpravy.

Studie vznikla v rámci Vědeckého výboru výživy zvířat.

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