

Vědecký výbor výživy zvířat

Uplatnění řas ve výživě drůbeže

Milan Marounek, Dagmar Dušková

Praha, duben 2020



ISBN 978-80-7403-231-8

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Zdroje karotenoidů u drůbeže.....	3
3. Řasy ve výživě nosnic.....	5
4. Řasy ve výživě kuřecích brojlerů.....	15
5. Shrnutí.....	16
Seznam použitých a souvisejících pramenů.....	16

Seznam tabulek

Tabulka 1. Zastoupení karotenoidů a pigmentační účinnost řasy <i>Scenedesmus obliquus</i> a vojtěšky.....	5
Tabulka 2. Koncentrace karotenoidů ve žloutcích nosnic kontrolních (C) a nosnic, v jejichž dietě byla dehydrovaná <i>Chlorella</i> v množství 10 g/kg (P1) a 20 g/kg (P2).....	7
Tabulka 3. Obsah α -tokoferolu, retinolu a karotenoidů ve vejcích nosnic, v jejichž dietě byly syntetické karotenoidy Carophyll, lutein a suchá <i>Chlorella</i>	8
Tabulka 4. Účinek řasy a řepkového oleje na koncentraci cholesterolu v tkáni jater, abdominálního tuku a žloutku a vliv na tuk jater a exkrementů.....	12
Tabulka 5. Účinek řasy a řepkového oleje na koncentraci (mg/kg) vitaminů E, A a koncentraci karotenoidů v sušině žloutků.....	12
Tabulka 6. Účinek řasy a řepkového oleje na koncentraci neutrálních sterolů v exkrementech slepic ($\mu\text{mol/g DM}$).....	13
Tabulka 7. Účinek řasy a řepkového oleje na koncentraci ($\mu\text{mol/g DM}$) žlučových kyselin a celkových sterolů v exkrementech slepic.....	13
Tabulka 8. Konjugované žlučové kyseliny v tenkém střevu slepic ($\mu\text{mol/g DM}$).....	14

1. Úvod

Řasy jsou autotrofní organismy, které se řadí k nižším rostlinám. Disponují fotosyntézou, mají jednobuněčné i mnohobuněčné formy, nepřežívají v suchém prostředí. Jejich taxonomie se měnila a mění. Podle převládající barvy se dosud člení na zelené, hnědé a červené. Pro řasy je typický růst ve vodním prostředí. Řasy mají široké použití – jako potravina, krmivo, nebo zdroj pro výrobu biopaliv. Využitím řas ve výživě zvířat se u nás zabývá nedávná práce Sedlákové a Křížové (2019). Důraz klade na využití řas ve výživě dojnic a stručně zmiňuje i využití řas ve výživě monogastrických zvířat. V této studii popisujeme uplatnění řas ve výživě drůbeže.

Řasy používané ve výživě drůbeže patří hlavně k rodům *Chlorella* a *Spirulina*. *Chlorella* je rod sladkovodních jednobuněčných řas s vysokým obsahem chlorofylu. *Chlorella* má mnoho druhů, které lze odlišit jen sekvenováním DNA. V literatuře se nejčastěji setkáváme s druhem *Chlorella vulgaris*. Řasy jsou cenným zdrojem základních živin, polynenasycených mastných kyselin, stopových prvků, vitaminů a prebiotik. Řasy mají pevnou buněčnou stěnu. Stravitelnost řas je proto podmíněna jejím narušením. K tomu lze použít enzymy - celulasu a mannasu (Maffei a kol., 2018), ultrazvuk, elektroporaci, nebo některé způsoby sušení (Janczyk a kol., 2007). Evans a kol. (2015) uvádějí, že komerčně dostupná *Spirulina* obsahuje 76% proteinu, 4,9% tuku, 1,2% Ca a 1,08% nefytátového P. Thiamin a pyridoxin jsou v podobném množství jako v kukuřici (5,6 a 5,3 µg/g), vitamin C je v množství 68,5 mg/100 g, tokoferol 25,2 mg/100 g, což je více než ve vojtěškových úsuscích (Ismailkhodjaev a kol. 2019). Do úvodu studie patří i poznámka, že absorpce karotenoidů ve střevu a distribuce v tkáních závisí na složení diety a souvisí s tvorbou micel účinkem žlučových kyselin. Karotenoidy a triglyceridy se vstřebávají současně, ale triglyceridy se v plasmě objeví dřív. Xantofyly, které jsou více polární, se vstřebávají snáze než karoteny, což jsou uhlovodíky (Furr a Clark, 1997).

2. Zdroje karotenoidů u drůbeže

Chlorella je velmi dobrým zdrojem karotenoidů, kterých obsahuje 1,2 - 1,3% v sušině (Batista a kol., 2013). Ismailkhodjaev a kol. (2019) uvádějí, že *Chlorella* obsahuje 140 – 200 mg karotenu v 1 g, což je 3x víc než travní moučka. Kotrbáček a kol. (2013)

nalezli v sušině *Chlorelly*, kultivované heterotrofně lutein o koncentraci 248 mg/kg a zeaxanthin o koncentraci 241 mg/kg. Del Campo a kol. (2004) uvádějí, že lutein v neesterifikované formě byl zjištěn ve fotoautotrofně kultivovaném kmenu *Chlorella zofingiensis* v množství 4 mg/g sušiny a astaxanthin v množství 1,5 mg/g sušiny. Podobně i *Spirulina* je výborný zdroj karotenoidů. Anderson (1991) uvádí, že po lyofilizaci *Spirulina* obsahovala xanthofyly o celkové koncentraci 5787 mg/kg.

Ve snaze docílit optimální zbarvení žloutku vajec jsou do krmiva nosnic přidávány syntetické karotenoidy Carophyll® Red a Carophyll® Yellow od firmy DSM Nutritional Products. Carophyll Red® je karotenoid canthaxanthin a Carophyll Yellow® je ethylester β -apo-8'-karotenové kyseliny. Stejně karotenoidy vyrábí i firma BASF pod názvy Lucantin® Red a Lucantin® Yellow. Evropská agentura pro bezpečnost potravin vydala stanovisko, kterým omezila přídavek canthaxanthinu do krmiva na 25 mg pro ryby a drůbež kromě nosnic a 8 mg/kg pro nosnice. Důvodem je nebezpečí tvorby krystalků canthaxanthinu v sítnici. Toto omezení a snaha nahradit syntetické sloučeniny v krmivech přírodními produkty vedly k hledání alternativ vhodných pro získání takové barvy žloutku, která je vyžadována spotřebiteli. Alternativou může být extrakt květů aksamitníku (*Tagetes erecta*) jak ukazují Skřivan a kol. (2016). Dieta nosnic (Lohmann Brown) byla doplněna o max. 950 mg extraktu květů aksamitníku, který obsahoval 21,3 mg/kg luteinu a 9,65 mg/kg zeaxanthinu. Extrakt květů aksamitníku zvýšil obsah karotenoidů ve žloutku, oxidační stabilitu lipidů žloutku a žlutost a červenost měřené kolorimetrem Minolta. Podobné výsledky byly s extraktem květů aksamitníku získány u slepic ISA Brown (Skřivan a kol., 2015), a také s extraktem špenátu (Jang a kol. 2014). Zdrojem karotenoidů může být také usušená vojtěška s doplňkem palmového tuku nebo řepkového oleje (Marounek a kol. 2019). Vstřebání karotenoidů řepkový olej i palmový tuk zvýšily. Dalším zdrojem karotenoidů mohou být výlisky rajčat z výroby kečupu. Jsou výborným zdrojem lykopenu a po zařazení do diety nosnic zvýšily obsah lykopenu ve vejcích (Xue a kol., 2013).

Dalšími způsoby jak zvýšit zbarvení žloutku vajec je pastva (Skřivan a Engelmaierová, 2014), obohacení diety o drť ze suchých listů moruše (Lokaewmanee a kol., 2009), nebo o sušenou papriku (Lokaewmanee a kol., 2013).

3. Řasy ve výživě nosnic

Řasy jsou bohatým zdrojem karotenoidů, proto našly uplatnění ve výživě nosnic. Karotenoidy umožňují optimální zbarvení žloutku a zvyšují oxidační stabilitu jeho lipidů. Do žloutku ukládají nosnice karotenoidy přednostně (Loetscher a kol., 2014). Vejce jsou tudíž cenným zdrojem karotenoidů ve výživě člověka. Uvádíme přehled některých prací, které se použitím řas ve výživě nosnic zabývají:

Mader a kol. (1984) v práci **Řasy jako přirozený zdroj karotenoidů v krmných směsích pro nosnice** srovnali řasu *Scenedesmus obliquus* a vojtěškové úsušky. Řasa byla získána z Mikrobiologického ústavu ČSAV v Třeboni, byla mechanicky rozmělněna a sprayově usušena. Při stejné koncentraci karotenoidů ve směsích byla pigmentační účinnost řasy u vajec hybrida Babcock vyšší než úsušku vojtěšky. Autoři uvádějí relativní zastoupení xanthofylů a pigmentační účinnost (Tab. 1).

Tabulka 1. Zastoupení karotenoidů a pigmentační účinnost řasy *Scenedesmus obliquus* a vojtěšky

	Vojtěška			<i>Scenedesmus</i>		
	Relativní zastoupení r (%)	Pigmentační účinnost* n	r . n	Relativní zastoupení r (%)	Pigmentační účinnost* n	r . n
Lutein	40	1	40	58	1	58
Violaxanthin	34	0	0	11	0	0
Neoxanthin	19	0,08	1,5	13	0,08	1
Zeaxanthin	2	1	2	12	1	12
Kryptoxanthin	4	0,5	2	-	-	-

*Bauernfeind (1981)

Autoři uvádějí, že obsah karotenoidů ve žloutku se zvyšoval úměrně přidavku řasy do směsi a ani při nejvyšším přidavku (6%) nedošlo k saturaci. V průběhu skladování řasy obsah karotenů i xanthopylů klesal, přičemž karoteny degradují rychleji než xanthofyly.

Práce **Dietary selenium increases vitamin E contents in egg yolk** autorů Skřivan a kol. (2008) ukazuje, že řasy lze použít i k jinému účelu než je barva žloutku. V práci s nosnicemi ISA Brown byla řasa *Chlorella* s vysokým obsahem selenu srovnána s dalšími zdroji Se (seleničitanem a selenovými kvasinkami). *Chlorella* obsahovala 380 mg Se/kg, vesměs v proteinech (46%) a nízkomolekulárních sloučeninách (44%). Doplněk Se zvýšil obsah α -tokoferolu v sušině žloutku z 297 mg/kg na 311 mg/kg v případě seleničitanu, zatímco na 375 mg/kg u Se-kvasinek a na 370 mg/kg v případě *Se-Chlorelly*. Výsledky ukazují lepší využitelnost Se je-li podán v organické formě. Podobně byl zvýšen obsah Se ve vzorcích svalů a jater v navazujícím pokuse s kuřecími brojlery.

Práce **Comparison of marine algae (*Spirulina platensis*) and synthetic pigment in enhancing egg yolk colour of laying hens** (Zahroojian a kol., 2011) srovnává mořskou řasu a syntetické karotenoidy Lucantin® Yellow (30 mg/kg) a Lucantin® Red (35 mg/kg). *Spirulina platensis* podaná nosnicím v množství 1,5, 2,0 a 2,5% krmné směsi sestávající z pšenice a sojového šrotu byla účinkem na barvu žloutku rovnocenná syntetickým karotenoidům.

V další práci **Effect of different dietary concentrations of brown marine algae (*Sargassum dentifebium*) prepared by different methods on plasma and yolk lipid profiles, yolk total carotene and lutein plus zeaxanthin of laying hens** (Al-Harti a El-Deek 2012) byla zdrojem karotenoidů pro nosnice hnědá mořská řasa. Řasa byla usušena na slunci, uvařena nebo autoklávována. Spektrum analýz bylo rozšířeno o profil lipidů plasmy a žloutku. Cholesterol v plasmě a žloutku byl ve skupinách s přidavkem řasy (3% a 6%) významně snížen. Při vyšším přidavku řasy byl v lipidech žloutku zvýšen obsah kyseliny palmitové a olejové. Současně byl ve žloutku nalezen vyšší obsah luteinu, zeaxanthinu a β -karotenu.

Heterotrofně kultivovaná *Chlorella* byla použita v práci **Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic *Chlorella*** (Kotrbaček a kol. 2013). Heterotrofní řasy obsahují méně chlorofylu, ale více xanthofylů. Dieta nosnic Hisex Brown byla doplněna o 10 a 20 g suché *Chlorelly*/kg (diety P1 a P2). Základem kontrolní diety byla pšenice, kukuřice a sojový šrot. Již po týdnu podávání diet byla koncentrace karotenoidů v žloutcích signifikantně zvýšena. Následuje srovnání koncentrace karotenoidů ve skupině kontrolní (C) a skupinách pokusných:

Tabulka 2. Koncentrace karotenoidů ve žloutcích nosnic kontrolních (C) a nosnic, v jejichž dietě byla dehydrovaná *Chlorella* v množství 10 g/kg (P1) a 20 g/kg (P2)

(µg/g)	C	P1	P2
Veškeré karotenoidy	17,3 ^a	25,3 ^b	37,9 ^c
Lutein	7,1 ^a	10,7 ^b	15,4 ^c
Zeaxanthin	7,1 ^a	10,4 ^b	15,9 ^c
β-Karoten	1,1 ^a	1,5 ^b	2,1 ^c
Cis-Zeaxanthin	0,7 ^a	1,0 ^b	1,9 ^c
Cis-Lutein	0,8 ^a	1,2 ^b	1,6 ^c

^{a-c} P<0,05

Vyšší obsah karotenoidů ve vejcích se promítl do vyšší intenzity barevného zbarvení žloutku. Neměl vliv na váhu vajec.

Práce **A comparison of lutein, spray-dried *Chlorella*, and synthetic carotenoids effects on yolk colour, oxidative stability, and reproductive performance of laying hens** (Engelmaierová a kol. 2013) představuje srovnání třech způsobů pro zvýšení obsahu karotenoidů ve vejcích a zvýšení oxidační stability lipidů vajec. *Chlorella* byla získána z Mikrobiologického ústavu AV ČR (Třeboň) a byla kultivována autotrofně. *Chlorella* byla do krmiva nosnic ISA Brown přidána v množství 12,5 g/kg, lutein 250 mg/kg,

Carophyll® Red 20 mg/kg a Carophyll® Yellow 15 mg/kg. Obsah vitaminů a karotenoidů v žloutcích byl následující:

Tabulka 3. Obsah α -tokoferolu, retinolu a karotenoidů ve vejcích nosnic, v jejichž dietě byly syntetické karotenoidy Carophyll, lutein a suchá *Chlorella*

(mg/kg DM)	Kontrola	Carophyll	Lutein	<i>Chlorella</i>
α -Tokoferol	143 ^{ab}	147 ^a	130 ^c	136 ^{bc}
Retinol	10,1 ^c	10,7 ^b	11,2 ^a	10,6 ^b
β -Karoten	0,05 ^b	0,04 ^b	0,10 ^b	0,36 ^a
Lutein	12,8 ^c	11,5 ^c	134 ^a	49 ^b
Zeaxanthin	9,2 ^c	8,7 ^c	123,9 ^a	40 ^b

^{a-c} P<0,05

Barva žloutku rostla v pořadí kontrola – *Chlorella* – Carophyll – lutein. Všechny karotenoidy (i syntetické) zvýšily oxidační stabilitu lipidů vajec, měřenou produkcí malondialdehydu.

Práce **The effects of different levels of *Chlorella* microalgae on blood biochemical parameters and trace mineral concentrations of laying hens reared under heat stress condition** (Kor a kol. 2016) informuje o použití řasy u nosnic v podmínkách tepelného stresu (27,5 – 36,7°C). *Chlorella* při přidavku 200 – 500 mg/kg snížila sérový cholesterol, triglyceridy a LDL cholesterol. Zvýšila sérový HDL cholesterol, jod a selen.

Jeon a kol. (2012) se v práci **The production of lutein-enriched eggs from dietary *Chlorella*** zabývají účinkem řasy *Chlorella vulgaris* na snášku obsah luteinu ve vejcích. V prvním ze dvou pokusů byla nosnicím Hy-Line Brown přidána do diety suchá *Chlorella* 0,1-0,5% po dobu 6 týdnů. Přídavek řasy zvýšil snášku a barvu žloutku úměrně dávkování. V 2. pokusu byla *Chlorella* přidána v množství 0,5-2,0% po 4 týdny. Po dvou

týdnech byl lutein ve vejcích významně zvýšen při dávkování min. 1,0%. *Chlorellu* lze proto použít k produkci vajec s vyšším obsahem luteinu.

Mikrořasy (též mikrofyty) mají pevnou buněčnou stěnu. Práce **Mikroalgae disruption techniques for product recovery** (Alhattab a kol. 2019) upozorňuje, že výhodnost použití řas ve výživě zvířat závisí na nákladech, které s výrobou souvisí. Extrakce lipidů se děje pomocí rozpouštědel, což předpokládá narušení buněk chemickou, enzymatickou nebo mechanickou cestou. Jsou k tomu používány povrchově aktivní látky, sonikace, působení páry, mikrovln, vysoký tlak ve spojení s teplotou, enzymy, nebo jen mletí.

Práce **Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris*** (Janczyk a kol. 2009) potvrzuje, že řasy mohou mít vliv na složení mikroflóry v trávicím traktu drůbeže. *Chlorella vulgaris* byla sprayově usušena, nebo mleta v kulovém mlýnu. Mikroflóra z volete a slepých střev slepic byla vyšetřena DGGE (denaturační gelovou elektroforézou). Výsledky ukázaly na velké zastoupení laktobacilů, přičemž řasa zvýšila jejich diverzitu. Sekvence, které byly z gelu získány, ukázaly přítomnost zástupců Ruminococcaceae, Lachnospiraceae a laktobacily. Samotný způsob úpravy řasy před podáním slepicím neměl na výsledek vliv.

Způsobem přípravy řas obohacených o selen se zabývá práce **Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review** (Doucha a kol. 2009). Je známo, že organické formy selenu jsou zvířaty využívány lépe než seleničitan či selenát. K výrobě řas obohacených o selen byla vypracována technologie spočívající v heterotrofní kultivaci *Chlorelly*, kdy zdrojem Se byl seleničitan, zdrojem dusíku močovina a zdrojem energie glukosa. Během kultivace byl fermentor provzdušňován. Po sprayovém usušení *Chlorelly* lze selenovou řasu podávat zvířatům. Její účinky jsou rovnocenné selenovým kvasinkám. Práce autorů z třeboňského pracoviště Mikrobiologického ústavu AV ČR se také zabývá významem selenu u zvířat i lidí a metodami jeho stanovení.

S antibakteriální aktivitou řas souvisejí práce **Activity of antibacterial substance in *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* at various stages of their development cycle and the influence of light on the process** (Matusiak a kol. 1965),

a studie **Effect of green alga *Planktochlorella nurekis* on selected bacteria revealed antibacterial activity *in vitro*** (Čermák a kol. 2015). Zelená řasa *Planktochlorella nurekis* vytváří antimikrobiálně působící směs mastných kyselin C14 – C22, která se podobá chlorellinu u *Chlorella vulgaris*. Největší její inhibiční účinek byl zjištěn u bifidobakterií, *Escherichia coli*, salmonel, *Campylobacter jejuni* a *Arcobacter butzleri*. Růst *Lactobacillus johnsonii* byl naopak stimulován. Přes polovinu mastných kyselin u *P. nurekis* byly nasycené kyseliny.

Fermentovaná *Chlorella vulgaris* byla použita ve studii **The dietary effect of fermented *Chlorella vulgaris* (CBT®) on production performance, liver lipids and intestinal microflora in laying hens** (Zheng a kol. 2012). Dieta nosnic Hy-line Brown byla doplněna o fermentovanou *Chlorellu* CBT® v množství 0, 1, 2 g/kg. Úměrně přídávku *Chlorelly* se zvýšila produkce vajec i barva žloutku a Haughovy jednotky. Zvýšil se i počet laktobacilů v slepých střevech. Snížila se koncentrace triglyceridů v játrech. Příjem krmiva nebyl ovlivněn. Lze shrnout, že fermentovaná *Chlorella vulgaris* měla u nosnic řadu pozitivních účinků.

Práce **Enrichment of poultry products with omega 3 fatty acids by dietary supplementation with the alga *Nannochloropsis* and mantur oil** (Nitsan a kol. 1999) pojednává o použití mikrořasy s unikátním složením mastných kyselin, *Nannochloropsis* sp. Má v lipidech vysoké zastoupení kyseliny eikosapentaenové (EPA, 20:5, omega 3), bez dalších mastných kyselin této řady. Řasa také obsahuje karotenoidy zvyšující zabarvení žloutku. V pokuse s nosnicemi byla moučka z řasy přidána do diety v množství 0,1-1%. EPA z řasy se nehromadila v žloutku ani v játrech, ale měnila na kyselinu dokosahexaenovou (C 22:6, DHA, omega 3), která přecházela do žloutku i jater. Kyselina linolenová (C 18:3, omega 3) z manturového oleje byla zčásti změněna na DHA a rovněž obohatila lipidy žloutku a jater.

Autoři práce **Effect of an enzymatic treatment with cellulase and mannanase on the structural properties of *Nannochloropsis microalgae*** (Maffei a kol. 2018) zjistili, že kombinace dvou enzymů schopných narušit buněčnou stěnu řasy, která má unikátní složení lipidů, zvýší výtěžek extrakce z 40,8% na 73%. Zvýšil se poměr krystalické a amorfní formy celulózy. Elektronová mikroskopie ukázala velké změny morfologie buněk, rozrušení buněčných stěn a uvolnění jejich intracelulárního obsahu.

Směs enzymů doporučuje také práce **A two-enzyme constituted mixture to improve the degradation of *Arthrospira platensis* microalga cell wall for monogastric diets** (Coelho a kol. 2019). Směs enzymů tvořil lysozym a α -amylasa. Degradaci buněčné stěny řasy ukázalo uvolnění redukujících cukrů do média. V supernatantu ošetřené suspenze vzrostl obsah proteinu, nenasycených mastných kyselin a chlorofylu. Ošetření řasy směsí enzymů ji učinilo vhodnou pro zařazení do diet monogastrických zvířat.

Další práce je **Effect of the alga *Chlorella* alone and in combination with rapeseed oil on carotenoids and lipophilic vitamins in eggs** (Engelmaierová a kol. 2020). Účelem studie bylo zjistit vliv kombinace řasy a řepkového oleje na obsah karotenoidů, vitamínu A a E a cholesterol ve vejcích. Dále, zjistit typ konjugace žlučových kyselin (glycin, taurin). Byly použity nosnice Hisex Brown. *Chlorella vulgaris* (0,5% suché formy) byla kultivována heterotrofně. Řepkový olej (5%) byl přidán do diety poloviny slepic s řasou, řasa byla rovněž přidána do diety poloviny nosnic. Sběr vajec proběhl dvakrát v 48. a 68. týdnu věku. Na konci pokusu byly slepice poraženy a odebrány vzorky. Uspořádání pokusu je zřejmé ze 4. tabulky, rovněž i výsledky. K analýzám byly použity tradiční i chromatografické metody. Lipidy byly extrahovány směsí 2:1 chloroform-metanol. Cholesterol ve žloutku, játrech a abdominálním tuku byl stanoven na plynovém chromatografu po silylaci, rovněž fekální steroly (GC MS). Literární odkazy na použité metody jsou v citované práci Marounek a kol. (2017). Tam je také uveden postup stanovení konjugátů žlučových kyselin v obsahu tenkého střeva kapalinovou chromatografií (HPLC). Kapalinová chromatografie byla použita i pro stanovení α -tokoferolu, retinolu, luteinu, zeaxanthinu a β -karotenu ve žloutcích.

Tabulka 4. Účinek řasy a řepkového oleje na koncentraci cholesterolu v tkáni jater, abdominálním tuku a žloutku a vliv na tuk jater a exkrementů

<i>Chlorella</i> (%)	0		0,5	
Řepkový olej (%)	–	5	–	5
Cholesterol (mg/kg)				
Žloutek	18,35 ^a	17,61 ^a	14,48 ^b	14,02 ^a
Játra	2,90 ^{ab}	2,89 ^{ab}	2,71 ^b	3,09 ^a
Tuk	1,04 ^a	0,81 ^b	1,16 ^a	1,03 ^a
Tuk				
Játra (g/kg)	56,2	51,7	56,0	48,4
Exkrementy (% DM)	0,38 ^b	0,32 ^b	1,00 ^a	0,48 ^b

^{ab} P<0,05

Chlorella významně snížila cholesterol ve žloutku. Řepkový olej zvýšil cholesterol v játrech u slepic přijímajících řasu. U nich řepkový olej snížil koncentraci tuku v exkrementech.

Tabulka 5. Účinek řasy a řepkového oleje na koncentraci (mg/kg) vitaminů E, A a koncentraci karotenoidů v sušině žloutků

<i>Chlorella</i> (%)	0		0,5	
Řepkový olej (%)	–	5	–	5
α-Tocopherol	54,2 ^b	123,1 ^a	56,7 ^b	123,3 ^a
Retinol	7,59 ^b	7,79 ^b	9,44 ^a	10,40 ^a
Lutein	4,94 ^c	3,97 ^c	28,7 ^b	34,6 ^a
Zeaxanthin	2,42 ^c	1,95 ^c	21,3 ^b	26,7 ^a
β-Karoten	< 0,01 ^c	< 0,01 ^c	0,06 ^b	0,12 ^a

^{a-c} P<0,05

Řepkový olej zdvojnásobil koncentraci α -tokoferolu ve žloutcích. *Chlorella* zvýšila koncentraci karotenoidů ve žloutcích, ne však koncentraci α -tokoferolu.

Tabulka 6. Účinek řasy a řepkového oleje na koncentraci neutrálních sterolů v exkrementech slepic ($\mu\text{mol/g DM}$)

<i>Chlorella</i> (%)	0		0,5	
Řepkový olej (%)	–	5	–	5
Cholesterol	6,10	5,83	5,65	5,77
Koprostanol	0,65	0,69	0,73	0,66
Fytosteroly	13,11 ^b	20,25 ^a	15,52 ^b	21,24 ^a
Veškeré steroly	19,86 ^b	26,77 ^a	21,90 ^b	27,67 ^a

^{ab} $P < 0,05$

Koncentrace cholesterolu a koprostanolu byly podobné u všech skupin nosnic. Fytosterolů bylo v exkrementech víc než neutrálních sterolů. Množství fytosterolů bylo zvýšeno přidavkem řepkového oleje.

Tabulka 7. Účinek řasy a řepkového oleje na koncentraci ($\mu\text{mol/g DM}$) žlučových kyselin a celkových sterolů v exkrementech slepic

<i>Chlorella</i> (%)	0		0,5	
Řepkový olej (%)	–	5	–	5
Veškeré žlučové kyseliny	2,17	2,20	1,76	1,80
Veškeré steroly	22,03 ^b	28,97 ^a	23,66 ^b	29,47 ^a

^{ab} $P < 0,05$

Hlavní žlučová kyselina v exkrementech byla kyselina chenodeoxycholová. Množství žlučových kyselin bylo nízké a nebylo ovlivněno ani *Chlorellou* ani řepkovým olejem.

Tabulka 8. Konjugované žlučové kyseliny v tenkém střevu slepic (μmol/g DM)

Žlučové kyseliny	Řepkový olej	
	0	5 g/kg
Taurocholová	1,36	0,63
Taurochenodeoxycholová	10,39	4,37
Veškeré konjugáty	11,75	4,56

V tenkém střevu byly nalezeny konjugáty kyseliny cholové a chenodeoxycholové s taurinem. Přítomnost konjugátů žlučových kyselin s glycinem nebyla zjištěna. Řepkový olej neměl na koncentraci konjugovaných žlučových kyselin vliv. Velká variabilita nálezů.

Výše uvedené výsledky tohoto pokusu zaslouží diskusi. Dehydratovaná *Chlorella* snížila koncentraci cholesterolu ve žloutku, což bylo pozorováno i v jiných pokusech s řasami, např. již zmíněném pokuse s mořskou řasou *Sargassum dentifebium*, v pokuse s řasou *Porphyridum* sp. (Ginzberg a kol. 2000), v pokuse s řasou *Spirulina platensis* (Dogan a kol. 2016). Koncentrace fytoosterolů v exkrementech byla větší než koncentrace sterolů endogenního původu, protože fytoosteroly se nevstřebávají. Skutečnost, že byly nalezeny jen konjugáty primárních žlučových kyselin (cholové a chenodeoxycholové) ukazuje, že syntéza žlučových kyselin a jejich konjugace v játrech probíhají současně.

Práce **Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens** (Fredriksson a kol. 2006) pojednává o použití mořské řasy *Nannochloropsis oculata* ve výživě nosnic. Řasa byla nosnicím podána v množství 0, 10 a 20% sušiny diety. Řasa zvýšila barvu žloutku, karotenoidy a obsah kyseliny eikosapentaenové a dokosahexaenové v lipidech. Obě cenné mastné kyseliny byly nalézány ve žloutku ve frakci fosfolipidů.

4. Řasy ve výživě kuřecích brojlerů

V podstatně menší míře než u nosnic se řasy uplatňují ve výživě kuřecích brojlerů. Zvyšují obsah cenných látek v mase, jeho oxidační stabilitu a také barvu kůže, aby byla pro spotřebitele na pohled přijatelnější. V rámci naší studie uvádíme tyto příklady:

V práci **Effects of algae incorporation into broiler starter diet formulations on nutrient digestibility and 3 to 21 d bird performance** (Evans a kol. 2015) byla použita komerčně dostupná *Spirulina* sp. Autoři měřili zjevnou ileální stravitelnost aminokyselin a pravou stravitelnost aminokyselin. Připravili krmné směsi s 0, 6, 11, 16 a 21% řasy. Směs s nejvyšším zastoupením řasy zhoršila růst kuřat, užitkovost až do 16% obsahu řasy byla stejná jako u kontroly. Všechny krmné směsi s řasou zvýšily příjem stravitelného methioninu.

Práce **Efficacy of *Chlorella pyrenoidosa* to ameliorate the hepatotoxic effects of aflatoxin B-1 in broiler chickens** (Subhani a kol. 2018). *Chlorella pyrenoidosa* již byla použita jako stimulátor imunity. Krmná směs brojlerových kuřat byla kontaminována aflatoxinem B-1, 350 µg/kg. Etanolický extrakt řasy byl do krmiva přidán v množství 250 a 500 mg/kg. Kontaminovaná směs významně snížila příjem krmiva a růst, sérový protein a antioxidační kapacitu. Naopak zvýšila peroxidaci lipidů. Negativní působení aflatoxinu B-1 bylo zmírněno při vyšším přídávku etanolického extraktu řasy *Chlorella pyrenoidosa*.

Další práce **A mutated rabbit defensin NP-1 produced by *Chlorella ellipsoidea* can improve the growth performance of broiler chickens** (Fan a kol. 2019) otevírá další pole uplatnění řas. Autoři genovou manipulací připravili kmen *Chlorelly* produkující defensin NP-1 (antimikrobiální peptid). Kmen se dá kultivovat ve velkém s výtěžkem defensinu 90-105 mg/l. V pokuse s kuřaty řasa zvýšila růst o 9,3-12,9% a zlepšila morfologii duodena.

5. Shrnutí

Řasy jsou alternativním zdrojem některých živin, zejména však cenných látek jako vitaminy, polynenasycené mastné kyseliny a karotenoidy. Ve výživě drůbeže našly uplatnění jako náhrada syntetických karotenoidů ve snaze docílit optimální zbarvení žloutku, současně však zvyšují oxidační stabilitu drůbežích produktů. Použitím řas ve výživě nosnic se zvýší obsah karotenoidů ve vejcích, zejména luteinu, který je spolu s zeaxanthinem přítomen v oční sítnici a chrání zrak před reaktivními formami kyslíku. Studie uvádí řadu příkladů použití řas ve výživě drůbeže, včetně dávkování a docíleného účinku. Zmíněno je i použití řas jako zdroje selenu, použití ve výživě kuřecích brojlerů, účinek na cholesterol ve vejcích a vliv na mikroorganismy. Na konkrétním příkladu je ukázáno, že karotenoidy se lépe vstřebají po přidavku tuku do krmiva. Novým poznatkem je zjištění, že žlučové kyseliny jsou u nosnic konjugovány s taurinem a že syntéza a konjugace jsou v játrech spojené procesy.

Seznam použitých a souvisejících pramenů

- Al-Harti, M.A., El-Deek, A.A. Effect of different dietary concentrations of brown marine algae (*Sargassum dentifebium*) prepared by different methods on plasma and yolk lipid profiles, yolk total carotene and lutein plus zeaxanthin of laying hens. Italian Journal of Animal Science 11, art. No. UNSPe64, 2012.
- Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A., Brooks, M.S.L. Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. Journal of Applied Phycology 31(1), 61-88, 2019. DOI: 10.1007/s10811-018-1560-9
- An, B.K., Jeon, J.Y., Kang, C.W., Kim, J.M., Hwang, J.K. The Tissue Distribution of Lutein in Laying Hens Fed Lutein Fortified *Chlorella* and Production of Chicken Eggs Enriched with Lutein. Korean Journal for Food Science of Animal Resources 34(2) 172-177, 2014.
- An, B.K., Kim, K.E., Jeon, J.Y., Lee, K.W. Effect of dried *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* growth factor on growth performance, meat qualities and humoral immune

responses in broiler chickens. View Web of Science ResearcherID and ORCID. Springerplus 5(718), 2016. DOI: 10.1186/s40064-016-2373-4

Anderson, D.W., Tang, C.S., Ross, E.: The xanthophylls of *Spirulina* and their effect on egg-yolk pigmentation. Poultry Science 70, 115-119, 1991.

Barclay, W.R., Meager, K.M., Abril, J.R. Heterotrophic production of long-chain omega-3-fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. Journal of Applied Phycology 6 (2), 123-129 1994. DOI: 10.1007/BF02186066

Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M., Raymundo, A.: Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. Algal Research 2, 163-173, 2013.

Bauernfeind, J.C.(ed.). Carotenoids and Colorants and Vitamin A Precursors: Technological and Nutritional Application. New York, Academic Press 1981.

Camacho, F., Macedo, A., Malcata, F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short review, Marine Drugs. 17 (6) 2019. DOI: 10.3390/md17060312

Čermák, L., Pražáková, S., Marounek, M., Skřivan, M., Skřivanová, E. Effect of green alga *Planktochlorella nurekii* on selected bacteria revealed antibacterial activity in vitro. Czech Journal of Animal Science 60, (10), 427-435 2015. DOI: 10.17221/8522-CJAS

Coelho, D., Lopes, P.A., Cardoso, V., Ponte, P., Bras, J., Madeira, M.S., Alfaia, C.M., Bandarra, N.M., Fontes, C.M.G.A., Prates, J.A.M. A two-enzyme constituted mixture to improve the degradation of *Arthrospira platensis* microalga cell wall for monogastric diets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 104, 310-321, 2019.

Del Campo, J.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). Applied Microbiology and Biotechnology 64 (6), 848-854, 2004. DOI: 10.1007/s00253-003-1510-5

- Dogan, S.C., Baylan, M., Erdogan, Z., Akpinar, G.C., Kucukgul, A., Duzguner, V. Performance, egg quality and serum parameters of Japanese quails fed diet supplemented with *Spirulina platensis*. *Fresenius Environmental Bulletin* 25, 5857-5862, 2016.
- Doucha, J., Livansky, K., Kotrbacek, V., Zachleder, V. Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, (6), 1001-1008 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-2058-9
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources: Scientific Opinion on the re-evaluation of canthaxanthin (E 161g) as a food additive. *EFSA Journal* 8: 1852 (42 pp.), 2010.
- Engelmaierová, M., Marounek, M., Skřivan, M., Dušková, D. Effect of the alga *Chlorella vulgaris* alone and in combination with rapeseed oil on carotenoids and lipophilic vitamins in eggs. *European Poultry Science* 84, 2020, DOI: 10.1399/eps.2020.298.
- Engelmaierová, M., Skřivan, M., Bubancová, I. A comparison of lutein, spray-dried *Chlorella*, and synthetic carotenoids effects on yolk colour, oxidative stability, and reproductive performance of laying hens. *Czech Journal of Animal Science* 58, 412-419, 2013.
- Evans, A.M., Smith, D.L., Moritz, J.S.: Effects of algae incorporation into broiler starter diet formulations on nutrient digestibility and 3 to 21 d bird performance. *Journal of Applied Poultry Research* 24, 206-214, 2015.
- Fan, C.M., Wu, J.H., Xu, L., Bai, L.L., Yang, H.M., Yan, C.J., Wu, Q, Chen, Y.H., Hu, Z.M. A mutated rabbit defensin NP-1 produced by *Chlorella ellipsoidea* can improve the growth performance of broiler chickens. *Scientific Reports* 9 (art. no.12778) 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-49252-4
- Fredriksson, S., Elwinger, K., Pickova, J. Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. *Food Chemistry* 99, 530-537, 2006.

- Furr, H.C., Clark, R.M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *Journal of Nutritional Biochemistry* 8, (7), 364-377, 1997. DOI: 10.1016/S0955-2863(97)00060-0
- Ginzberg, A., Cohen, M., Sod-Moriah, S., Rosenshtrauch, A., Arad, S. Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *Journal of Applied Phycology* 12, 325-330, 2000.
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., Empis, J. *Chlorella vulgaris* used to colour egg yolk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70 (2) 167-172, 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199602)70:2<167:AID-SFA472>3.0.CO;2-2
- Ismailkhodjaev, B.Sh., Khalmurzayeva, B.A., Satayev, M.I., Alibekov, R.S.: Study of vitamins content of microalgae. *News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan* 4, 19-24, 2019.
- Janczyk, P., Franke, H., Souffrant, W.B. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Animal Feed Science and Technology* 132, (1-2), 163-169, 2007. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.03.007
- Janczyk, P., Halle, B., Souffrant, W.B. Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris*. *Poultry Science* 88 (11), 2324-2332 2009. DOI: 10.3382/ps.2009-00250
- Jang, I., Ko, Y., Kang, S., Kim, S., Song, M., Cho, K., Ham, J., Sohn, S.: Effects of dietary lutein sources on lutein-enriched egg production and hepatic antioxidant system in laying hens. *Journal of Poultry Science* 51, 58-65, 2014.
- Jeon, J.Y., Kim, K.E., Im, H.J., Oh, S.T., Lim, S.U., Kwon, H.S., Moon, B.H., Kim, J.M., An, B.K., Kang, C.W. The Production of Lutein-Enriched Eggs with Dietary *Chlorella*. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 32, (1), 13-17, 2012. DOI: 10.5851/kosfa.2012.32.1.13
- Kor, N.M., Akbari, M., Olfati, A. The effects of different levels of *Chlorella* microalgae on blood biochemical parameters and trace mineral concentrations of laying hens

reared under heat stress condition. *International Journal of Biometeorology* 60, 757-762, 2016.

Kotrbaček, V., Skřivan, M., Kopecký, J., Pěnkava, O., Hudečková, P., Uhríková, I., Doubek, J.: Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic *Chlorella*. *Czech Journal of Animal Science* 58, 193-200, 2013.

Lemahieu, C., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Muylaert, K., Buyse, J., Foubert, I. Impact of feed supplementation with different omega-3 rich microalgae species on enrichment of eggs of laying hens. *Food Chemistry* 141, (4), 4051-4059 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.06.078

Loetscher, Y., Kreuzer, M., Messikommer, R.E. Late laying hens deposit dietary antioxidants preferentially in the egg and not in the body. *Journal of Applied Poultry Research* 23, 647-660, 2014.

Lokaewmanee, K., Mompanuon, S., Khumpeerawat, P., Yamauchi, K. Effects of dietary mulberry leaves (*Morus alba* L.) on egg yolk color. *Journal of Poultry Science* 46, 112-115, 2009.

Lokaewmanee, K., Yamauchi, K., Okuda, N. Effects of dietary red pepper on egg yolk colour and histological intestinal morphology in laying hens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97, 986-995, 2013.

Madeira, M.S., Cardoso, C., Lopes, P.A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N.M., Prates, J.A.M. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science* 205, 111-121 2017. DOI: 10.1016/j.livsci.2017.09.020.

Mader, P., Mikolášek, A., Lidická, M., Nováková, V., Hartlová, L., Staněk, J. Řasy jako přirozený zdroj karotenoidů v krmných směsích pro nosnice. *Živočišná výroba* 29, 557-567, 1984.

Maffei, G., Bracciale, M.P., Broggi, A., Zuurro, A., Santarelli, M.L., Lavecchia, R.: Effect of an enzymatic treatment with cellulose and mannanase on the structural properties of *Nannochloropsis* microalgae. *Bioresource Technology* 249, 592-598, 2018.

Marounek, M., Skřivan, M., Engelmaierová, M.: Effect of dietary fat on the content of vitamins and carotenoids in egg yolks. *European Poultry Science* 83, 2019.

- Marounek, M., Volek, Z., Skřivanová, E., Taubner, T. Comparative study of the hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of alginate and amidated alginate in rats. *International Journal of Biological Macromolecules* 105, 620-624, 2017.
- Matusiak, K., Jaroszyńska, T., Krzywicka, A. Activity of antibacterial substance in *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* at various stages of their development cycle and the influence of light on the process. *Bulletin L'Academie Polonaise des Sciences. Série des Sciences Biologiques* 13 (11), 667-71, 1965.
- Nitsan, Z., Mokady, S., Sukenik, A. Enrichment of poultry with omega 3 fatty acids by dietary supplementation with the alga *Nannochloropsis* and mantur oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 5127-5132, 1999.
- Sedláková, K., Křížová, L.: Možnosti využití mořských a sladkovodních řas ve výživě. *Náš chov* 11/2019, str. 53-57.
- Skřivan, M., Engelmaierová, M. The deposition of carotenoids and α -tocopherol in hen eggs produced under a combination of sequential feeding and grazing. *Animal Feed Science and Technology* 190, 79-86, 2014.
- Skřivan, M., Engelmaierová, M., Skřivanová, E., Bubancová, I.: Increase in lutein and zeaxanthin content in the eggs of hens fed marigold flower extract. *Czech Journal of Animal Science* 60, 89-96, 2015.
- Skřivan, M., Marounek, M., Dlouhá, G., Ševčíková, S. Dietary selenium increases vitamin E contents in egg yolk and chicken meat. *British Poultry Science* 49, 482-486, 2008.
- Skřivan, M., Marounek, M., Engelmaierová, M., Skřivanová, E.: Effect of increasing doses of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract on eggs carotenoids content, colour and oxidative stability. *Journal of Animal and Feed Sciences* 25, 58-64, 2016.
- Subhani, Z., Shahid, M., Hussain, F., Khan, J.A. Efficacy of *Chlorella pyrenoidosa* to ameliorate the hepatotoxic effects of aflatoxin B-1 in broiler chickens. *Pakistan Veterinary Journal*. 38 (1) 13-18, 2018. DOI: 10.29261/pakvetj/2018.00
- Thakare, R., Alamoudi, J.A., Gautam, N., Rodrigues, A.D. Species differences in bile acids I. Plasma and urine bile acid composition. *Journal of Applied Toxicology* 38, 1323-1335, 2018.

- Xue, F., Li, C., Pan, S.Y.: In vivo antioxidant activity of carotenoid powder from tomato by product and its use as a source of carotenoids for egg-laying hens. *Food & Function* 4, 610-617, 2013.
- Zahroojian, N., Moravej, H., Shivazad, M. Comparison of marine algae (*Spirulina platensis*) and synthetic pigment in enhancing egg yolk colour of laying hens. *British Poultry Science* 52, 584-588, 2011.
- Zheng, L., Oh, S.T., Jeon, J.Y., Moon, B.H., Kwon, H.S., Lim, S.U., An, B.K., Kang, C.W. The Dietary Effects of Fermented *Chlorella vulgaris* (CBT (R) on Production Performance, Liver Lipids and Intestinal Microflora in Laying Hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25, (2), 261-266, 2012. DOI: 10.5713/ajas.2011.11273

Abstract

Algae are the source of important nutrients, vitamins, polyunsaturated fatty acids and antioxidants, including carotenoids. In the poultry nutrition, carotenoids of algae represent an alternative to synthetic carotenoids, which are routinely used in the practice to obtain a colour of yolks acceptable by consumers. Carotenoids also increase the oxidative stability of poultry products. Feeding laying hens with algae increases content of carotenoids in eggs. Lutein and zeaxanthin are the most important algal micronutrients in this respect as both carotenoids are deposited in the retina and protect eyes from harmful reactive oxygen species. In the present study, various examples of the use of algae in poultry nutrition are presented, including dosing and achieved effect. Algae enriched with selenium represent the alternative to commercial selenium yeast. Algae can be also used in the nutrition of broilers in order to obtain an optimum colour of skin. Algae tend to decrease the cholesterol content in eggs. The effect of algae on the crop and caeca bacteria is also worth of attention. Supplements of fat, e.g. rapeseed oil, increase the absorption of carotenoids in the gut. Our new finding is the information that in hens bile acids are conjugated with taurine. No bile acids conjugated with glycine were found in the intestinal digesta. Bile acids synthesis and their conjugation with taurine in the liver are coupled processes.