

# Kazalniki *in vitro* fermentacije in tvorba hlapnih maščobnih kislin iz nestrukturnih ogljikovih hidratov pri kuncih

Andrej LAVRENČIČ<sup>1</sup>, Ajda KERMAUNER<sup>1,2</sup>

Delo je prispelo 21. julija 2022, sprejeto 10. oktobra 2022.

Received July 21, 2022; accepted October 10, 2022.

## Kazalniki *in vitro* fermentacije in tvorba HMK iz nestrukturnih ogljikovih hidratov pri kuncih

**Izvleček:** Šest čistih nestrukturnih ogljikovih hidratov (glukoza, fruktoza, saharoza,  $\beta$ -glukan iz ječmena, inulin iz cikoriije (inulin-C) in inulin nedefiniranega izvora (inulin-N)) smo inkubirali v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev, in spremljali kazalnike kinetike *in vitro* tvorbe plina (skupna potencialna tvorba plina (B), največja hitrost fermentacije (MFR), čas, v katerem je MFR dosežena (TMFR), časovni zamik fermentacije (Lag), tvorba plina (Gas8) in hitrost fermentacije pri 8 urah inkubacije (FR8)) in vsebnosti hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 8 urah fermentacije. MFR so bili največji, TMFR pa najkrajši pri fermentaciji sladkorjev: glukoze (MFR 36,0 ml/h; TMFR 8,6 h), fruktoze (MFR 38,6 ml/h; TMFR 9,6 h) in saharoze (MFR 33,2 ml/h; TMFR 9,4 h). Najslabše je fermentiral  $\beta$ -glukan (MFR 12,5 ml/h; TMFR 15,3 h), inulina pa sta fermentirala zelo različno: inulin-N hitreje in intenzivneje (MFR 32,3 ml/h; TMFR 8,3 h), podobno kot sladkorji, inulin-C pa počasni in s slabo intenzivnostjo (MFR 30,5 ml/h; TMFR 11,5 h). Tvorba HMK je bila največja pri sladkorjih in inulinu-N, majhna pri inulinu-C in najmanjša pri  $\beta$ -glukanu ( $p < 0,05$ ). Molarni delež očetne kisline je bil pri sladkorjih in inulinu-N manjši kot pri inulinu-C in  $\beta$ -glukanu, pri katerih je bil delež maslene kisline najmanjši ( $p < 0,05$ ).

**Ključne besede:** kunci; prehrana živali; *in vitro* fermentacija; plinski test; nestrukturni ogljikovi hidrati; sladkorji; neškrobni polisaharidi; HMK

## *In vitro* fermentation parameters and VFA production of non-structural carbohydrates in rabbits

**Abstract:** Six pure non-structural carbohydrates (glucose, fructose, sucrose,  $\beta$ -glucan, chicory inulin (inulin-C) and inulin of undefined source (inulin-N)) were incubated anaerobically in the inoculum prepared from rabbit caecum content and the kinetic parameters of *in vitro* gas production (total potential gas production (B), maximum fermentation rate (MFR), time when MFR was reached (TMFR), lag phase (Lag), the amount of gas (Gas8) and fermentation rate at 8 hours of incubation (FR8)) and volatile fatty acids (VFA) production after 8 hours were determined. MFRs were the greatest and TMFRs the shortest with the fermentation of sugars: glucose (MFR 36.0 ml/h; TMFR 8.6 h), fructose (MFR 38.6 ml/h; TMFR 9.6 h) and sucrose (MFR 33.2 ml/h; TMFR 9.4 h). Fermentation was the lowest in  $\beta$ -glucan (MFR 12.5 ml/h; TMFR 15.3 h), while fermentation of the two inulins was very different: fermentation of inulin-N was intensive and fast and similar to sugars (MFR 32.3 ml/h; TMFR 8.3 h), while inulin-C fermented slowly and with low intensity (MFR 30.5 ml/h; TMFR 11.5 h). VFA production after 8 hours of incubation was the highest for simple sugars and inulin-N, low for inulin-C, and the lowest for  $\beta$ -glucan ( $p < 0.05$ ). The molar proportion of acetic acid was lower in sugars and inulin-N than in inulin-C and  $\beta$ -glucan, which had the lowest molar proportion of butyric acid ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** rabbits; animal nutrition; *in vitro* fermentation; gas test; non-structural carbohydrates; sugars; non-starch polysaccharides; VFA

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Domžale, Slovenija

<sup>2</sup> Korespondenčni avtor, e-naslov: Ajda.Kermauner@bf.uni-lj.si

## 1 UVOD

Zaužiti ogljikovi hidrati so za kunce najpomembnejši vir energije. Del teh ogljikovih hidratov se prebavlja z lastnimi prebavnimi encimi do konca tankega črevesa, medtem ko je drugi del sestavljen iz ogljikovih hidratov, za katere žival encimov ne izloča in preidejo v debelo črevo, kjer jih mikrobiota lahko fermentira. Prebavljivi ogljikovi hidrati so mono- in disaharidi (npr. glukoza, fruktoza, saharoza), oligosaharidi in nekateri polisaharidi, npr. škrob. Ti se običajno hitro in učinkovito prebavijo in absorbirajo v prvem delu prebavil in služijo kot pomemben vir hitro dostopne energije. Pri kuncih se mono- in disaharidi učinkovito prebavijo do konca tankega črevesa, a bi se v slepem črevesu lahko pojavili kot produkt kislinske hidrolize celuloze v želodcu, kjer je pri kuncih okolje zelo kislo, pH-vrednost je med 1,5 in 2,0 (Fortun-Lamothe in Gidenne, 2006). Tisti ogljikovi hidrati, ki se ne prebavijo do konca tankega črevesa z lastnimi prebavnimi encimi, pa lahko pri kuncih v precejšnjem obsegu fermentirajo v slepem črevesu. To so predvsem neškrobni polisaharidi (NŠP), rezistentni škrob in nekateri oligosaharidi. Glavni vir teh, v tankem črevesu neprebavljivih ogljikovih hidratov v krmi za kunce so NŠP. Ti so lahko topni (npr. pektini,  $\beta$ -glukani) ali netopni (npr. celuloza). Gidenne in sod. (2020) navajajo, da se pri kuncih pred slepim črevesom lahko prebavi tudi do 37 % vseh NŠP.

Gidenne (1997) navaja, da je stabilna in učinkovita mikrobna fermentacija v slepem črevesu za zdravje kunca nepogrešljiva. Prva stopnja tega fermentacijskega procesa je razgradnja NŠP na oligo-, di- in monosaharide s pomočjo encimov, ki jih izloča mikrobiota v slepem črevesu. Sproščeni sladkorji nato fermentirajo v pline in hlapne maščobne kisline (HMK). Značilnosti fermentacije topnih, torej hitro razgradljivih NŠP (pektinov), pa tudi slabše topnih in netopnih, torej počasneje razgradljivih NŠP (celuloza, ksilan) pri kuncih so opisali že Lavrenčič (2007) in Kermauner in Lavrenčič (2010). V literaturi smo našli tudi nekaj podatkov o *in vitro* fermentaciji krmnih mešanic z različnimi vsebnostmi NŠP (npr. Belenguer in sod., 2011) ali različnih čistih substratov in krmil (npr. Kermauner in Lavrenčič, 2008a, 2008b; Ocasio-Vega in sod., 2018), nekaj raziskav o fermentaciji inulina ter sladkorjev pri kuncih (npr. Marounek in sod., 1997, 2000; Slovakova in sod., 2002; Yang in sod., 2010), medtem ko podatkov o fermentaciji  $\beta$ -glukanov pri kuncih v dostopni literaturi nismo našli.

Inulin je fruktan, sestavljen iz molekul fruktoze, med seboj povezanih z  $\beta$ -2,1 vezmi, zato z lastnimi prebavnimi encimi živali ni prebavljiv. V prehrani neprežvekovalcev in ljudi ga uporabljamo kot prebiotik in ima vrsto ugodnih učinkov, saj ugodno vpliva na črevesno mikrobioto in na imunski sistem, deluje protivnetno, uravnava pre-

snovo maščob in povečuje absorpcijo rudninskih snovi pri ljudeh in živalih (Tawfik in sod., 2022). Volek in sod. (2007) so ugotovili, da dodatek inulina ugodno vpliva na mikrobno aktivnost v slepem črevesu kunccev, saj se je zmanjšalo pojavljanje prebavnih motenj, ki v intenzivni reji kunccev povzročajo največ težav.  $\beta$ -glukane sicer uvrščamo v skupino v vodi topnih polisaharidov, kjer so v linearno verigo z  $\beta$ -1,3 in  $\beta$ -1,4 vezjo povezane molekule glukoze, a so De Arcangelis in sod. (2019) ugotovili, da je pri različnih sortah ječmena lahko delež v vodi netopnih  $\beta$ -glukanov med 16 in 30 %. Tudi  $\beta$ -glukani niso prebavljivi z lastnimi prebavnimi encimi živali, zato jih uporabljamo kot prebiotike, ki povečujejo tvorbo HMK, ugodno vplivajo na prebavo, zmanjšujejo glikemični indeks in holesterol v krvi, imajo antimikrobne in antikanterogene učinke, pomagajo pri kontroli sladkorne bolezni, srčno-žilnih bolezni, pospešujejo imunski odgovor organizma in podobno, nepogrešljivi pa so tudi v živilski industriji (Kaur in sod., 2020).

Fermentacijsko aktivnost mikrobiote v slepem črevesu lahko ocenimo z različnimi metodami. Pogosto so s pomočjo štetja mikrobnih celic ocenjevali aktivnost posameznih bakterijskih vrst v vsebini slepega črevesa (Williams in sod., 2001). Z metodami, ki ocenjujejo tvorbo mikrobnih beljakovin (tvorba ATP; Venkateswaran in sod. (2003)) in/ali produktov fermentacije, predvsem HMK (Kermauner in sod., 1996; Marounek in sod., 1997; Gidenne in sod., 2002), pa lahko ocenimo aktivnost celotne mikrobne populacije v slepem črevesu. Tudi tehnika plinskega testa v kombinaciji z določanjem HMK je zelo uporabna metoda za oceno mikrobne aktivnosti (Calabro in sod., 1999; Lavrenčič, 2007; Villamide in sod., 2009; Kermauner in Lavrenčič, 2010), Carabaño in sod. (2006) pa podajajo podroben pregled tehnik za ugotavljanje mikrobne aktivnosti v slepem črevesu pri kuncih.

S pričujočo študijo smo želeli ugotoviti razlike v kazalnikih kinetike produkcije plina in tvorbi HMK iz različnih nestrukturiranih ogljikovih hidratov, ki smo jih inkubirali v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kunccev.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 SUBSTRATI

Kot substrat smo uporabili šest čistih ogljikovih hidratov: dva monosaharida (glukoza, Sigma G8270, in fruktoza, Sigma F0127), en disaharid (saharoz, Sigma S9378) in tri NŠP: inulin iz cikoriije, Sigma I2250 (inulin-C), inulin nedefiniranega izvora, ki smo ga dobili z Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (inulin-N), in  $\beta$ -glukan iz ječmena, Sigma G6513.

## 2.2 IN VITRO FERMENTACIJA

Za pripravo inokuluma smo odvzeli vsebino slepega črevesa dveh 78 dni starih kuncev slovenske mesne linije SIKA. Oskrba živali in postopki priprave so potekali po protokolu, ki ga je opisal Lavrenčič (2007). Tvorbo plina v *in vitro* plinskem testu smo ugotavljali po proceduri, ki sta jo opisala Menke in Steingass (1988). Dvesto miligramov substrata smo anaerobno inkubirali pri 39 °C v 100 ml steklenih brizgah, ki smo jim dodali 30 ml inokuluma. Za vsak substrat smo pripravili 4 brizge, poskus smo izvajali v dveh ponovitvah. Meritve smo prvih 12 ur izvajali vsaki 2 uri, nato pa še po 24, 36, 48, 72 in 96 urah fermentacije.

## 2.3 DOLOČANJE Hlapnih maščobnih kislin (HMK)

Dve od štirih steklenih brizg s posameznim vzorcem iz vsake ponovitve smo po 8 urah fermentacije vzeli iz vodne kopeli, njihovo vsebino prelili v 50-ml centrifugirne epruvete in jih zamrznili pri -20 °C do analize vsebnosti HMK. Ekstrakte za določanje vsebnosti HMK smo pripravili po modificirani metodi, ki so jo opisali Holderman in sod. (1977). Uporabili smo plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 A (Hewlett Packard, ZDA), opremljen s split/splitless injektorjem in FID detektorjem. Za ločevanje posameznih HMK smo uporabili 30 m NUKOL TM, FUSED SILICA kapilarno kolono (SUPELCO, ZDA).

## 2.4 IZRAČUNI IN STATISTIČNA OBDELAVA

Meritve *in vitro* tvorbe plina smo korigirali na vsebnost suhe snovi v substratu in na tvorbo plina iz slepih vzorcev. Z Gompertzovim modelom (Lavrenčič in sod., 1997) smo ocenili kazalnike *in vitro* produkcije plina: skupno potencialno tvorbo plina (parameter »B«; ml/g SS), specifično hitrost fermentacije (parameter »C«) in faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (parameter »A«). Pri tem smo uporabili nelinearno regresijo (Proc NLIN; SAS Institute Inc., 2015). Iz dobljenih kazalnikov Gompertzovega modela smo izračunali največjo hitrost fermentacije (MFR; ml/h), čas, ko je bila ta dosežena (TMFR; h), prostornino sproščenega plina po 8 urah fermentacije (Gas8; ml/g SS), hitrost fermentacije po 8 urah (FR8; ml/h) in časovni zamik začetka fermentacije (lag phase, Lag; h).

Pri izračunu količine skupnih in posameznih HMK po 8 urah fermentacije smo upoštevali količino HMK

v slepih vzorcih in vsebnost suhe snovi v posameznem substratu.

Statistično analizo smo opravili s proceduro GLM v statističnem paketu SAS (SAS Institute Inc., 2015), kjer smo v model vključili substrat kot fiksni vpliv, razlike v kazalnikih fermentacije in vsebnostih HMK med posameznimi substrati pa smo testirali z Duncanovim Multiple Range testom.

## 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Parametre plinskega testa prikazujemo v preglednici 1, na sliki 1a pa vidimo potek krivulje tvorbe plina iz posameznih substratov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev. Skupna potencialna količina plina (parameter B) je bila pri vseh substratih večja od 330 ml/g SS, največja pri fermentaciji saharoze (386 ml/g SS), najmanjša pa pri fermentaciji inulina iz cikoriije (inulin-C, 338 ml/g SS). Podobne vrednosti smo izmerili v plinskem testu pri različnih nestrukturiranih polisaharidih pri kuncih, npr. pri škrobu (Lavrenčič, 2007; Kermauner in Lavrenčič, 2012) ali pektinu (Lavrenčič, 2007), kjer izvor (jabolčni, pesni in citrusovi) ni vplival na potencialno tvorbo plina (Kermauner in Lavrenčič, 2010).

V dostopni literaturi so zabeležene zelo velike razlike v količini proizvedenega plina pri kuncih za različne substrate. Belenguer in sod. (2011) so po 6 urah fermentacije pri kuncih izmerili samo med 21 in 25 ml plina/g SS

**Preglednica 1:** Ocenjeni kazalniki kinetike *in vitro* tvorbe plina iz nestrukturiranih polisaharidov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev

**Table 1:** Estimated *in vitro* gas production kinetic parameters of non-structural carbohydrates, incubated in inoculum prepared from rabbit caecum content

Substrat	B (ml/g SS)	C	A
Glukoza	353 <sup>bc</sup>	11,8 <sup>bc</sup>	0,277 <sup>ab</sup>
Fruktoza	345 <sup>c</sup>	25,3 <sup>a</sup>	0,306 <sup>a</sup>
Saharaza	386 <sup>a</sup>	9,4 <sup>bc</sup>	0,234 <sup>b</sup>
Inulin-C	338 <sup>c</sup>	17,3 <sup>ab</sup>	0,246 <sup>b</sup>
Inulin-N	367 <sup>b</sup>	7,5 <sup>bc</sup>	0,240 <sup>b</sup>
β-glukan	342 <sup>c</sup>	4,5 <sup>c</sup>	0,099 <sup>c</sup>
RMSE	13,1	7,31	0,0383
R <sup>2</sup>	0,976	0,532	0,762

<sup>a, b, c, d</sup> = vrednosti v posameznih stolpcih, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično značilno razlikujejo pri  $p < 0,05$

RMSE = standardni odklon ostanka; R<sup>2</sup> = koeficient determinacije

B = skupna potencialna tvorba plina; C = specifična hitrost fermentacije; A = faktor mikrobne (ne)učinkovitosti

**Preglednica 2:** Izračunani kazalniki *in vitro* tvorbe plina iz nestrukturnih ogljikovih hidratov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev

**Table 2:** Calculated parameters of the *in vitro* gas production of non-structural carbohydrates, incubated in inoculum prepared from rabbit caecum content

Substrat	MFR (ml/h)	TMFR (h)	Gas8 (ml/g SS)	FR8 (ml/h)	Lag (h)
Glukoza	36,0 <sup>ab</sup>	8,6 <sup>c</sup>	106 <sup>ab</sup>	35,1 <sup>a</sup>	5,0 <sup>bc</sup>
Fruktoza	38,6 <sup>a</sup>	9,6 <sup>c</sup>	66 <sup>c</sup>	31,9 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>
Saharoza	33,2 <sup>ab</sup>	9,4 <sup>c</sup>	99 <sup>b</sup>	31,5 <sup>a</sup>	4,9 <sup>bc</sup>
Inulin-C	30,5 <sup>b</sup>	11,5 <sup>b</sup>	33 <sup>d</sup>	18,3 <sup>b</sup>	7,4 <sup>a</sup>
Inulin-N	32,3 <sup>ab</sup>	8,3 <sup>c</sup>	125 <sup>a</sup>	31,9 <sup>a</sup>	4,1 <sup>c</sup>
β-glukan	12,5 <sup>c</sup>	15,3 <sup>a</sup>	46 <sup>cd</sup>	9,1 <sup>c</sup>	5,1 <sup>bc</sup>
RMSE	4,97	0,97	15,6	4,24	0,93
R <sup>2</sup>	0,850	0,905	0,846	0,883	0,878

<sup>a, b, c, d</sup> = vrednosti v posameznih stolpcih, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično značilno razlikujejo pri  $p < 0,05$ ; RMSE = standardni odklon ostanka; R<sup>2</sup> = koeficient determinacije;

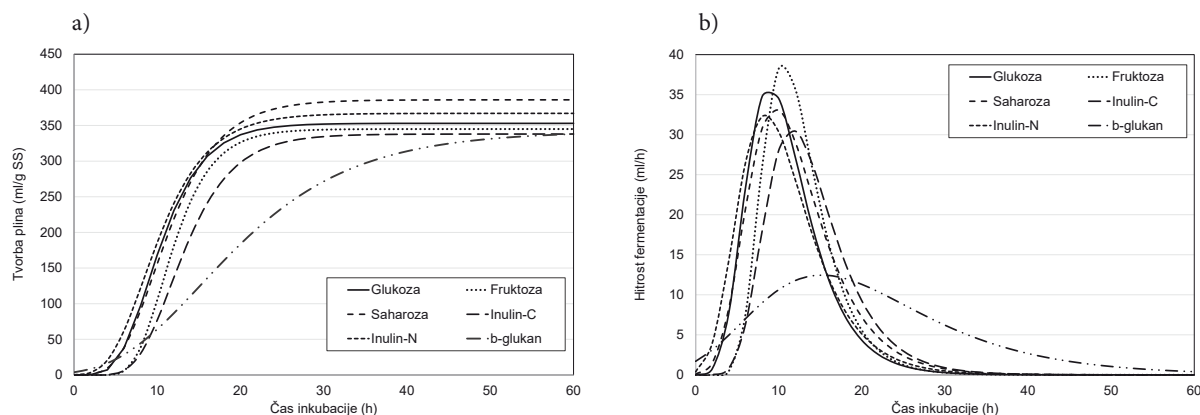
MFR = največja hitrost fermentacije; TMFR = čas, v katerem je MFR dosežena; Gas8 = količina plina po 8 urah fermentacije; FR8 = hitrost fermentacije pri 8 urah inkubacije; Lag = časovni zaostanek začetka fermentacije

krmne mešanice z različno sestavo, Ocasio-Vega in sod. (2018) pa po 24 urah fermentacije med 15 (pšenična slama) in 94 ml/g SS (celobioza). Ferreira in sod. (2019) so izmerili 318 ml/g SS pri koruznem zrnju, 256 ml/g SS pri pšeničnih otrobih in 138 ml plina/g SS pri lucerninem senu, Marounek in sod. (1997) pa po 8 urah fermentacije pri kuncih okrog 200 ml plina/g inulina, kar je bistveno več kot v našem poskusu.

Če naše rezultate primerjamo z *in vitro* fermentacijo pri drugih živalskih vrstah ali pri človeku, ugotovimo, da je bila fermentacija inulina pri kuncih v našem poskusu podobna kot pri človeku (Karpainen in sod., 2000) in pri sesnih pujskih (Williams in sod., 2005), pri odstavljenih

pujskih pa je bila tvorba plina iz inulina nekoliko manjša (Pellikaan in sod., 2007).

Raziskav o fermentabilnosti β-glukana pri kuncih v literaturi nismo zasledili. Količina plina, nastalega pri fermentaciji ječmenovega β-glukana pri kuncih v našem poskusu, je bila večja od tiste, ki so jo izmerili pri fermentaciji ovsenih otrobov (Karpainen in sod., 2000) in β-glukana iz ovsca (Lu in sod., 2021) v človeškem blatu, pa tudi pri fermentaciji β-glukana v blatu prašičev (Lu in sod., 2020). Lu in sod. (2021) menijo, da na obseg fermentacije β-glukana vplivajo tako izvor in sestava celičnih sten posameznih žit kot tudi vrsta uporabljenega inokuluma.



**Slika 1:** Rezultati *in vitro* plinskega testa nestrukturnih ogljikovih hidratov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev a) krivulja poteka tvorbe plina in b) krivulja hitrosti fermentacije

**Figure 1:** Results of *in vitro* gas test of non-structural carbohydrates in inoculum, prepared from rabbit caecum content a) gas production kinetics and b) fermentation rates kinetics

Precej večje razlike kot pri parametru B smo zasledili pri specifični hitrosti fermentacije (parameter C), ki je variirala od 4,5 pri  $\beta$ -glukanu do 25,3 pri fruktozi, kjer se je statistično značilno ( $p < 0,05$ ) razlikovala od ostalih substratov (razen od inulina-C). Razlike v parametru C med ostalimi substrati so bile velike, a večinoma neznatne, podobno kot je za škrob, pektin in ksilan ugotovil Lavrenčič (2007), medtem ko sta pri pektinih različnega izvora Kermauner in Lavrenčič (2010) ugotovila veliko manjše razlike (od 2,6 do 5,5), podobno kot Ferreira in sod. (2019) za različna krmila (od 2,7 do 4,2). Kazalnik A, ki označuje mikrobno (ne)učinkovitost, je bil za večino substratov zelo podoben (med 0,234 in 0,277), nekoliko višji je bil le pri fruktozi (0,306), a značilno nižji pri  $\beta$ -glukanu (0,099). Podobne vrednosti sta dobila pri pektinih različnih virov tudi Kermauner in Lavrenčič (2010), medtem ko je Lavrenčič (2007) izmeril precej nižji A (od 0,12 do 0,19) pri škrobu, pektinu in ksilanu. Do podobno nižjih vrednosti so prišli tudi Ferreira in sod. (2019) pri lucerninem senu (0,18), pšeničnih otrobih (0,12) in koruznem zrnju (0,09).

Izračunani kazalniki tvorbe plina in hitrosti so prikazani v preglednici 2, potek hitrosti fermentacije pa na sliki 1b. Največja hitrost fermentacije (MFR) je bila podobna pri večini substratov, znašala je od 30,5 ml/h pri inulinu-C do 38,6 ml/h pri fruktozi, razlika med tema dvema vrednostma je bila tudi statistično značilna. Veliko slabše pa je fermentiral  $\beta$ -glukan (MFR 12,5 ml/h,  $p < 0,05$ ). Tudi čas, v katerem je bila MFR dosežena (TMFR), se je pri večini substratov malo razlikoval, od 8,3 pri inulinu-N do 9,6 ur pri fruktozi, z veliko večjim TMFR pa sta močno odstopala inulin-C (11,5 ur) in  $\beta$ -glukan (15,3 ur).

Pellikaan in sod. (2007) so izmerili precej manjšo MFR in krajši TMFR pri fermentaciji inulina v človeškem blatu, rezultati fermentacije cikorijskih inulinov različnih proizvajalcev v blatu sesnih pujskov pa so bili bolj podobni našim, čeprav z nekoliko nižjimi MFR (Williams in sod., 2005). Karppinen in sod. (2000) so ugotovili, da je bil inulin v *in vitro* pogojih pri človeku popolnoma porabljen v 4 urah fermentacije. Naši rezultati tega ne kažejo, saj je pri inulinu-N fermentacija dosegla vrh šele po dobrih 8 urah, pri inulinu-C pa celo po več kot 11 urah (preglednica 2).

Marounek in sod. (1997) so v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev, izmerili obsežnejšo fermentacijo inulina v primerjavi s škrobom in hemicelulozami, a nekoliko manjšo od pektina. Tudi Karppinen in sod. (2000) so v inokulumu, pripravljenem iz blata človeka, ugotovili hitrejšo in obsežnejšo fermentacijo inulina v primerjavi z drugimi substrati (ovseni, pšenični in rženi otrobi), podobno so Pellikaan in sod. (2007) izmerili obsežnejšo in hitrejšo fermentacijo pri

substratu, ki je vseboval 40 % inulina in 60 % oligofruktanov, ne glede na krmno, ki so jo pujski dobivali pred odvzecom vsebine debelega črevesa za pripravo inokuluma. Williams in sod. (2005) so sicer ugotovili, da so razlike v fermentaciji cikorijskih inulinov različnih proizvajalcev velike, a so v povprečju bolj in hitreje fermentirali kot drugi substrati (inulin iz artičoke, različne vrste škrobov, netopne vlaknine) v inokulumu, pripravljenem iz blata sesnih pujskov. Očitno bi morali pri inulinu poznati več lastnosti, npr. stopnjo polimerizacije, in ne le izvora.

Ker je bila fermentacija inulina vedno hitrejša kot fermentacija  $\beta$ -glukana, lahko potrdimo ugotovitev, da tipi vezi med posameznimi molekulami sladkorjev v ogljikovih hidratih določajo tako obseg njihove fermentacije kot tudi hitrost fermentacije (Salvador in sod., 1993).

Največja hitrost fermentacije (MFR) ječmenovega  $\beta$ -glukana pri kuncih v našem poskusu je bila veliko manjša od hitrosti fermentacije  $\beta$ -glukana iz ovsu v blatu prašičev (Lu in sod., 2020), še posebej pa od fermentacije  $\beta$ -glukana v človeškem blatu (Lu in sod., 2021). Lu in sod. (2021) menijo, da je hitrost fermentacije najbolj odvisna od uporabljenega inokuluma, predvsem pa od tega, ali je bila mikrobiota inokuluma že navajena na določen substrat, kar potrjuje rezultate, ki smo jih dobili v naših raziskavah pri fermentaciji škroba pri različno starih kuncih (Lavrenčič, 2007).

Parameter Gas8 opisuje količino plina, ki se iz določenega substrata sprosti v 8 urah fermentacije, kar odgovarja povprečnemu času zadrževanja krme v slepem črevesu kuncev (Gidenne, 1997). Razlike med substrati so bile velike in večinoma statistično značilne, največ plina je v 8 urah nastalo iz inulina-N (125 ml/g SS) in glukoze (106 ml/g SS), najmanj pa iz  $\beta$ -glukana (46 ml/g SS) in inulina-C (33 ml/g SS) (preglednica 2). Največja hitrost fermentacije pri 8 urah (FR8) je bila zelo podobna pri večini substratov (med 31,5 in 35,1 ml/h), odstopala sta le inulin-C (18,3 ml/h) in  $\beta$ -glukan (9,1 ml/h), kjer je bila FR8 najnižja. Kljub tem razlikam v fermentaciji pa so bile vrednosti za Lag precej bolj podobne, čeprav sta se najkrajši (pri inulinu-N 4,1 h) in najdaljši Lag (pri inulinu-C 7,4 h) značilno razlikovala ( $p < 0,05$ ). Lag je definiran kot čas, ki je potreben za mikrobno kolonizacijo in za navlažitev substrata. Ker je v *in vivo* pogojih substrat že navlažen, je Lag odvisen le od hitrosti kolonizacije. Zato menimo, da je v *in vivo* pogojih Lag bistveno krajši kot v *in vitro* pogojih.

V preglednici 3 prikazujemo tvorbo HMK ter molarne deleže posameznih najpomembnejših HMK. Koncentracije HMK, nastalih ob fermentaciji sladkorjev in inulina-N, so bile zelo podobne (od 2,09 mmol/g SS pri fruktozi do 2,60 mmol/g SS pri inulinu-N), medtem ko je ob fermentaciji inulina-C in  $\beta$ -glukana nastalo veliko

**Preglednica 3:** Tvorba hlapnih maščobnih kislin (HMK) in molarne deleži očetne, propionske in maslene kisline, nastalih ob fermentaciji nestrukturiranih ogljikovih hidratov v 8 urah fermentacije v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev  
**Table 3:** Synthesis of volatile fatty acids (VFA) and molar proportions of acetate, propionate and butyrate produced from non-structural carbohydrates after 8 hours of fermentation in inoculum, prepared from rabbit caecum content

Substrat	HMK (mmol/g SS)	Očetna kislina (mmol/mmol HMK)	Propionska kislina (mmol/ mmol HMK)	Maslenska kislina (mmol/ mmol HMK)
Glukoza	2,25 <sup>a</sup>	0,558 <sup>c</sup>	0,129 <sup>b</sup>	0,313 <sup>b</sup>
Fruktoza	2,09 <sup>ab</sup>	0,564 <sup>c</sup>	0,119 <sup>b</sup>	0,318 <sup>b</sup>
Saharozna	2,26 <sup>a</sup>	0,573 <sup>c</sup>	0,086 <sup>c</sup>	0,341 <sup>a</sup>
Inulin-C	1,50 <sup>bc</sup>	0,623 <sup>a</sup>	0,132 <sup>a</sup>	0,244 <sup>c</sup>
Inulin-N	2,60 <sup>a</sup>	0,566 <sup>c</sup>	0,134 <sup>a</sup>	0,300 <sup>b</sup>
β-glukan	1,39 <sup>c</sup>	0,590 <sup>b</sup>	0,098 <sup>c</sup>	0,234 <sup>c</sup>
RMSE	0,428	0,0192	0,0127	0,0155
R <sup>2</sup>	0,649	0,832	0,935	0,920

<sup>a, b, c, d</sup> = vrednosti v posameznih stolpcih, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično značilno razlikujejo pri  $p < 0,05$  / means in columns with different superscripts are significantly different at the level  $p < 0.05$

RMSE = standardni odklon ostanka; R<sup>2</sup> = koeficient determinacije / determination coefficient

manj HMK (1,50 in 1,39 mmol/g SS). Ti rezultati so podobni rezultatom poskusa, ki sta ga opravila Kermauner in Lavrenčič (2011), kjer so pri različnih krmilih z večjo vsebnostjo ogljikovih hidratov izmerili med 2,86 mmol HMK/g SS pri dehidrirani lucerni in 1,50 mmol/g SS pri ječmenovem zrnju. Sta pa Kermauner in Lavrenčič (2011) ugotovila, da pri fermentaciji čistega škroba in koruznega zrnja nastane veliko manj HMK (0,38 in 0,80 mmol/g SS), kar je verjetno posledica omejene amilolitične aktivnosti mikroorganizmov v slepem črevesu kuncev (Kermauner in Lavrenčič, 2012).

Razmerja med posameznimi HMK se pri kuncih močno razlikujejo od drugih živalskih vrst. V vsebini slepega črevesa zdravih kuncev prevladuje očetna kislina (60 do 80 %), sledi ji maslena kislina (8 do 20 %), najmanj pa je propionske kisline (3 do 10 %) (Carabaño in sod., 2006). Običajno razmerje med propionsko in masleno kislino je med 0,5 in 0,8 (Gidenne in sod., 2020). Ti deleži in razmerja so odvisni od vrste substrata in zdravstvene stanja kuncev.

V našem poskusu se deleži posameznih HMK nekoliko razlikujejo od običajnih vrednosti. Izmerili smo manjši delež očetne kisline (med 55 in 62 mol%) ter večja deleža propionske (od 8 do 13 mol%) in maslene kisline (od 23 do 34 mol%), pri čemer pa je razmerje med propionsko in masleno kislino (med 0,25 in 0,54) ostalo v običajnih mejah. Objave o tvorbi HMK pri fermentaciji sladkorjev so za kunce zelo redke: pri fermentaciji glukoze je nastala enaka količina HMK kot pri fermentaciji ksiloze (Marounek in sod., 2000) ali celobioze (Yang in sod., 2010), medtem ko so se deleži posameznih HMK med substrati močno razlikovali. Zanimivo pa je, da smo v našem poskusu ugotovili največje razlike med

obema inulinoma. Iz inulina-N je nastalo največ HMK (2,60 mmol/g SS) z najmanjšim deležem očetne kisline (56,6 mol%), iz cikorijskega inulina (inulin-C) pa najmanj HMK (1,50 mmol/g SS) z največjim deležem očetne kisline (62,3 mol%) in najmanjšim deležem maslene kisline (24,4 mol%).

Marounek in sod. (1997) so v *in vitro* poskusu pri kuncih ugotovili manjši delež očetne kisline, znatno večji delež propionske in rahlo povečan delež maslene kisline pri fermentaciji inulina v primerjavi s škrobom, hemicelulozami ali pektini, pa tudi nekoliko večjo tvorbo skupnih HMK. Da ob fermentaciji inulina nastaja več HMK, so ugotovili tudi Castellini in sod. (2007), ki so obroku dodajali sveže liste cikorijske, in Volek in sod. (2007), ki so krmi za kunce dodajali cikorijski inulin, a je bil delež očetne kisline večji, delež propionske kisline pa manjši. Manjši delež propionske kisline sta izmerila tudi Volek in Marounek (2011) pri dodatku 10 % cikorijske korenine, kar se ne sklada z našimi rezultati, na HMK pa delež inulina ni vplival.

Maertens in sod. (2004) menijo, da fruktani z daljšo verigo (inulin) intenzivneje fermentirajo in tako močneje vplivajo na tvorbo in deleže HMK. Na osnovi tega lahko sklepamo, da je bila molekulska masa (dolžina verig) v inulinu-N večja kot v inulinu-C, saj je iz slednjega nastalo manj HMK z večjim deležem očetne kisline. Pellikaan in sod. (2007) k temu dodajajo še, da na tvorbo HMK in deleže posameznih HMK močno vpliva navajenost mikrobiote na substrat, saj sta se pri vseh uporabljenih inokuliranih ob fermentaciji substrata z inulinom povečala deleža očetne in propionske kisline, zmanjšal pa delež maslene kisline.

Iz β-glukana se je v našem poskusu tvorilo najmanj

HMK (1,39 mmol/g SS), delež očetne kisline je bil med večjimi (59,0 mol%), deleža propionske (9,8 mol%) in maslene kisline (23,4 mol%) pa najmanjša. Podatkov o fermentaciji  $\beta$ -glukana pri kuncih v dostopni literaturi nismo našli. Bai in sod. (2021a) so v *in vitro* poskusih na miših ugotovili, da se je iz  $\beta$ -glukana tvorilo več HMK kot iz fruktooligosaharidov (FOS) ali osnovne krme (Bai in sod., 2021b). Tudi Jha in sod. (2010) so ugotovili določene razlike v tvorbi in deležih HMK ob krmljenju različnih količin  $\beta$ -glukanov odstavljenim pujskom, a teh razlik niso mogli povezati z vsebnostjo  $\beta$ -glukanov v krmi. Tvorba HMK iz različnih vrst  $\beta$ -glukanov (iz ječmena ali ovs) z različnimi lastnostmi (dolžina verig, viskoznost) pri človeku je bila prav tako različna, v povprečju pa manjša v primerjavi z inulinom (Hughes in sod., 2008), nasprotno pa so Kaur in sod. (2011) izmerili večjo vsebnost HMK ob fermentaciji  $\beta$ -glukana v inokulumu, pripravljenem iz človeškega blata, v primerjavi s fermentacijo inulina. Navedene primerjave pa moramo jemati previdno, saj so pri kuncih deleži posameznih HMK drugačni kot pri drugih živalskih vrstah, s katerimi najpogosteje primerjamo fermentacijo v slepem črevesu kuncev (podgane, prašiči ali človek). Tvorba in deleži HMK namreč niso odvisni le od substrata, ampak predvsem od mikrobiote v debelem črevesu, ki pa se razlikuje med vrstami živali, pa tudi med posamezniki znotraj vrste (Karpinen in sod., 2000; Hughes in sod., 2008).

#### 4 SKLEPI

Znano je, da pri neprežvekovalcih veliko ogljikovih hidratov fermentira v debelem črevesu s pomočjo črevesne mikrobiote, vendar pa ni veliko študij, ki bi sistematično ugotavljale obseg in potek fermentacije ter tvorbo hlapnih maščobnih kislin pri kuncih. Enostavni sladkorji so sicer zelo dobro prebavljivi z lastnimi prebavnimi encimi v tankem črevesu, a se lahko pojavijo v debelem črevesu zaradi velike količine vlaknine v krmi za kunce ter kot produkt obsežne kisline hidrolize v želodcu. Mikrobiota v slepem črevesu kuncev zelo intenzivno fermentira neškrobne polisaharide (NŠP), od obsega in intenzivnosti te fermentacije pa je odvisno zdravstveno stanje in pogin kuncev v intenzivni reji. Intenzivnost fermentacije v slepem črevesu kuncev je odvisna od sestave mikrobiote in njene prilagojenosti na določen substrat, pa tudi od samega substrata, predvsem od tipa vezi med posameznimi monosaharidi, pa tudi od stopnje polimerizacije, dolžine in razvejanosti verige in drugih lastnosti ogljikovih hidratov. Pričakovano so glukoza, fruktoza in saharoza fermentirale najhitreje in v največjem obsegu. Ječmenov  $\beta$ -glukan je fermentiral najpočasneje in najmanj intenzivno, medtem ko sta oba tipa inulina fer-

mentirala zelo različno: inulin-N je fermentiral podobno kot sladkorji, inulin-C pa zelo počasi in z nizko intenzivnostjo. Tako velikih razlik med vrstama inulina nismo pričakovali. Ker v dostopni literaturi nismo našli veliko podatkov o fermentaciji nestrukturnih ogljikovih hidratov pri kuncih, smo dobljene rezultate lahko primerjali samo s fermentacijo le-teh pri drugih živalskih vrstah, pri tem pa se moramo zavedati, da obstajajo zelo velike razlike v sestavi same mikrobiote, kar ima za posledico tudi razlike v končnih produktih fermentacije. Glede na dobljene rezultate bi težko ocenili uporabnost preiskovanih nestrukturnih ogljikovih hidratov za zmanjševanje prebavnih motenj pri kuncih, saj bi bil najverjetneje najučinkovitejši inulin-N, za katerega pa nimamo podatkov o njegovih lastnostih. Zato bi bilo potrebno poskus razširiti in vanj vključiti ogljikove hidrate z dobro definiranimi lastnostmi.

#### 5 ZAHVALA

Avtorja se za odlično sodelovanje pri poskusu in za vse opravljeno delo zahvaljujeva Janiju Debeljaku, mag. inž. zoot.

#### 6 VIRI

- Bai, J., Li, Y., Zhang, W., Fan, M., Qian, H., Zhang, H., ... Wang, L. (2021a). Source of gut microbiota determines oat  $\beta$ -glucan degradation and short chain fatty acid-producing pathway. *Food Bioscience*, 41, 101010. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101010>
- Bai, J., Li, T., Zhang, W., Fan, M., Qian, H., Li, Y., Wang, L. (2021b). Systematic assessment of oat  $\beta$ -glucan catabolism during *in vitro* digestion and fermentation. *Food Chemistry*, 348, 129116. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129116>
- Belenguer, A., Fondevilla, M., Balcells, J., Abecia, L., Lachica, M., Carro, M. D. (2011). Methanogenesis in rabbit caecum as affected by the fermentation pattern - *in vitro* and *in vivo* measurements. *World Rabbit Science*, 19, 75–83. <https://doi.org/10.4995/wrs.2011.826>
- Calabro, S., Nizza, A., Pinna, W., Cutrignelli, M. I., Piccolo, V. (1999). Estimation of digestibility of compound diets for rabbits using the *in vitro* gas production technique. *World Rabbit Science*, 7, 197–201. <https://doi.org/10.4995/wrs.1999.401>
- Carabaño, R. Badiola, I., Licois, D., Gidenne, T. (2006). The digestive ecosystem and its control through nutritional or feeding strategies. V: L. Maertens in P. Coudert (ur.), *Recent advances in rabbit sciences*. (str. 211–227). Melle, ILVO. Pridobljeno s <http://world-rabbit-science.com/Documents/Cost848.pdf>
- Castellini, C., Cardinali, R., Rebollar, P. G., Dal Bosco, A., Jimeno, V., Cossu, M. E. (2007). Feeding fresh chicory

- (*Chicoria intybus*) to young rabbits: Performance, development of gastro-intestinal tract and immune functions of appendix and Peyer's patch. *Animal Feed Science and Technology*, 134(1–2), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.05.007>
- De Arcangelis, E., Djurle, S., Andersson, A. A. M., Marconi, E., Messia, M. C., Andersson, R. (2019). Structure analysis of  $\beta$ -glucan in barley and effects of wheat  $\beta$ -glucanase. *Journal of Cereal Science*, 85, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.12.002>
- Ferreira, F. N. A., Ferreira, W. M., Inácio, D. F. S., Silva Neta, C. S., Mota, K. C. N., Costa Júnior, M. B., ... Caicedo, W. O. (2019). *In vitro* digestion and fermentation characteristics of tropical ingredients, co-products and by-products with potential use in diets for rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, 252, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.03.011>
- Fortun-Lamothe, L., Gidenne, T. (2006). Recent advances in the digestive physiology of the growing rabbit. V: L. Maertens in P. Coudert (ur.), *Recent advances in rabbit sciences* (str. 202–210). Melle, ILVO. Pridobljeno s <http://world-rabbit-science.com/Documents/Cost848.pdf>
- Gidenne, T. (1997). Ceaco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science*, 51, 73–88. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(97\)00111-5](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(97)00111-5)
- Gidenne, T., Jehl, N., Segura, M., Michalet-Doreau, B. (2002). Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: impact of a dietary fibre deficiency and of intake level. *Animal Feed Science and Technology*, 99, 107–118. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00138-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00138-4)
- Gidenne, T., Lebas, F., Licois, D., Garcia, J. (2020). Nutrition and feeding strategy: impacts on health status. V: C. de Blas in J. Wiseman (ur.), *Nutrition of the rabbit* (str. 193–221), 3rd edition. CAB International. Pridobljeno s <https://hal.inrae.fr/hal-02569293/file/2020.Rabbit.Nutr%283rd.ed%29chap10%28nutrition%2Bfeed%2Bhealth%3D%29.pdf>
- Holdeman, L. V., Cato, E. P., Moore, W. E. C. (1977). Ether extraction of volatile fatty acids. V: *Anaerobe laboratory manual* (str. 1–132), 4th edition. Virginia: Southern Printing Company.
- Hughes, S. A., Shewry, P. R., Gibson, G. R., McCleary, B. V., Rastall, R. A. (2008). *In vitro* fermentation of oat and barley derived  $\beta$ -glucans by human faecal microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64(3), 482–493. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00478.x>
- Jha, R., Rossnagel, B., Pieper, R., Van Kessel, A., Leterme, P. (2010). Barley and oat cultivars with diverse carbohydrate composition alter ileal and total tract nutrient digestibility and fermentation metabolites in weaned piglets. *Animal*, 4(5), 724–731. <https://doi.org/10.1017/s1751731109991510>
- Karppinen, S., Liukkonen, K., Aura, A.-M., Forssell, P., Poutainen, K. (2000). *In vitro* fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1469–1476. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200008\)80:10<1469::AID-JSFA675>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200008)80:10<1469::AID-JSFA675>3.0.CO;2-A)
- Kaur, A., Rose, D. J., Rumpagaporn, P., Patterson, J. A., Hamaker, B. R. (2011). *In vitro* batch fecal fermentation comparison of gas and short-chain fatty acid production using “slowly fermentable” dietary fibers. *Journal of Food Science*, 76(5), H137–H142. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02172.x>
- Kaur, R., Sharma, M., Ji, D., Xu, M., Agyei, D. (2020). Structural features, modification, and functionalities of  $\beta$ -glucan. *Fibers*, 8(1), 1–30. <https://doi.org/10.3390/fib8010001>
- Kermauner, A., Lavrenčič, A. (2008a). Supplementation of rabbit diet with chestnut wood extract: effect on *in vitro* gas production from three sources of carbohydrates. V: *Proc.: 9<sup>th</sup> World Rabbit Congress*, 2008–06–10/13, Verona, Italy: 683–387. Pridobljeno s <http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2008-Verona/Papers/N-Kermauner1.pdf>
- Kermauner, A., Lavrenčič, A. (2008b). Supplementation of rabbit diet with chestnut wood extract: effect on *in vitro* gas production from two sources of protein. V: *Proc. 9<sup>th</sup> World Rabbit Congress*, 2008–06–10/13, Verona, Italy: 689–693. Pridobljeno s <http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2008-Verona/Papers/N-Kermauner2.pdf>
- Kermauner, A., Lavrenčič, A. (2010). *In vitro* fermentation of different commercially available pectins using inoculum from rabbit caecum. *World Rabbit Science*, 18, 1–7. Pridobljeno s <http://ojs.upv.es/index.php/wrs/article/view/671>
- Kermauner, A., Lavrenčič, A. (2011). *In vitro* SCFA production in most common rabbit feedstuffs. V: S. Hoy (ur.), *17. Internationale Tagung über Haltung und Krankheiten der Kaninchen, Pelztiere und Heimtiere* (str. 126–137). Celle, 11.–12. Mai 2011. Gießen: VVB Laufersweiler Verlag. Pridobljeno s [https://www.researchgate.net/publication/360890480\\_In\\_vitro\\_SCFA\\_production\\_in\\_most\\_common\\_rabbit\\_feedstuffs](https://www.researchgate.net/publication/360890480_In_vitro_SCFA_production_in_most_common_rabbit_feedstuffs)
- Kermauner, A., Lavrenčič, A. (2012). The *in vitro* caecal fermentation of different starch sources in rabbits. V: P. Dovč in N. Petrič (ur.), *Acta agriculturae Slovenica, Supplement 3: 20th International Symposium Animal Science days: Livestock production as a technological and social challenge* (str. 71–75). Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Pridobljeno s <http://aas.bf.uni-lj.si/zootehnika/supl/3-2012/PDF/3-2012-71-75.pdf>
- Kermauner, A., Štruklec, M., Marinšek Logar, M. (1996). Addition of probiotic to feed with different energy and ADF content in rabbits. 2. Effect on microbial metabolism in the caecum. *World Rabbit Science*, 4, 195–200. <https://doi.org/10.4995/wrs.1996.294>
- Lavrenčič, A. (2007). The effect of rabbit age on *in vitro* caecal fermentation of starch, pectin, xylan, cellulose, compound feed and its fibre. *Animal*, 1: 241–248. <https://doi.org/10.1017/S1751731107303467>
- Lavrenčič, A., Stefanon, B., Susmel, P. (1997). An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Animal Science*, 64(3), 423–431. <https://doi.org/10.1017/S1357729800016027>
- Lu, S., Flanagan, B. M., Williams, B. A., Mikkelsen, D., Gidley, M. J. (2020). Cell wall architecture as well as chemical composition determines fermentation of wheat cell walls



- by a faecal inoculum. *Food Hydrocolloids*, 107, 105858. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105858>
- Lu, S., Williams, B. A., Flanagan, B. M., Yao, H., Mikkelsen, D., Gidley, M. J. (2021). Fermentation outcomes of wheat cell wall related polysaccharides are driven by substrate effects as well as initial faecal inoculum. *Food Hydrocolloids*, 120, 106978. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106978>
- Maertens, L., Aerts, J. M., De Boever, J. (2004). Degradation of dietary oligofructose and inulin in the gastro-intestinal tract of the rabbit and the effects on caecal pH and volatile fatty acids. *World Rabbit Science*, 12, 235–246. <https://doi.org/10.4995/wrs.2004.569>
- Marounek, M., Brezina, P., Baran, M. (2000). Fermentation of carbohydrates and yield of microbial protein in mixed cultures of rabbit caecal microorganisms. *Arch. Anim. Nutr.*, 53, 241–252. <https://doi.org/10.1080/17450390009381950>
- Marounek, M., Vovk, S. J., Benda, V. (1997). Fermentation patterns in rabbit caecal cultures supplied with plant polysaccharides and lactate. *Acta Veterinaria Brno*, 67, 9–13. <https://doi.org/10.2754/avb199766010009>
- Menke, K. H., Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 375–386.
- Ocasio-Vega, C., Abad-Guamán, R., Delgado, R., Carabaño, R., Carro, M. D., García, J. (2018). *In vitro* caecal fermentation of carbohydrate-rich feedstuffs in rabbits as affected by substrate pre-digestion and donors' diet. *World Rabbit Science*, 26, 15–25. <https://doi.org/10.4995/wrs.2018.7854>
- Pellikaan, W. F., Verdonk, J. M. A. J., Shim, S. B., Vestegen, M. W. A. (2007). Adaptive capacity of faecal microbiota from piglets receiving diets with different types of inulin-type fructans. *Livestock Science*, 108, 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.087>
- Salvador, V., Cherbut, C., Barry, J. L., Bertrand, D., Bonnet, C., Delortlaval, J. (1993). Sugar composition of dietary fibre and short chain fatty acid production during *in vitro* fermentation of human bacteria. *British Journal of Nutrition*, 70, 189–197. [https://www.academia.edu/72576840/Sugar\\_composition\\_of\\_dietary\\_fibre\\_and\\_short\\_chain\\_fatty\\_acid\\_production\\_during\\_in\\_vitro\\_fermentation\\_by\\_human\\_bacteria?email\\_work\\_card=view-paper&li=5](https://www.academia.edu/72576840/Sugar_composition_of_dietary_fibre_and_short_chain_fatty_acid_production_during_in_vitro_fermentation_by_human_bacteria?email_work_card=view-paper&li=5)
- SAS Institute Inc. (2015). *SAS/STAT user's guide: Statistics*. Version 9.4. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Slovakova L., Duškova D., Marounek M. (2002). Fermentation of pectin and glucose and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Lett. Appl. Microb.*, 35, 126–130. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01159.x>
- Tawfick, M. M., Xie H., Zhao, C., Shao, P., Farag, M. A. (2022). Inulin fructans in diet: Role in gut homeostasis, immunity, health outcomes and potential therapeutics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 948–961. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.218>
- Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, M. T., Kern, R. (2003). ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean room facilities. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 367–377. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00192-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00192-6)
- Villamide, M. J., Carabaño, R., Maertens, L., Pascual, J., Gidenne, T., Falcao-e-Cunha, L., Xiccato, G. (2009). Prediction of the nutritional value of European compound feeds for rabbits by chemical components and *in vitro* analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 150, 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.09.007>
- Volek, Z., Marounek, M. (2011). Dried chicory root (*Cichorium intybus* L.) as a natural fructan source in rabbit diet: effects on growth performance, digestion and caecal and carcass traits. *World Rabbit Science*, 19, 143–150. <https://doi.org/10.4995/wrs.2011.850>
- Volek, Z., Marounek, M., Skrivanova, V. (2007). Effect of a starter diet supplementation with mannanoligosaccharide or inulin on health status, caecal metabolism, digestibility of nutrients and growth of early weaned rabbits. *Animal*, 1, 523–530. <https://doi.org/10.1017/S1751731107685012>
- Williams, B. A., Bosch, M. W., Boer, H., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S. (2005). An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 445–462. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.031>
- Williams, B. A., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S. (2001). Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews*, 14, 207–227. <https://doi.org/10.1079/NRR200127>
- Yang, H. J., Cao, Y. C., Zhang, D. F. (2010). Caecal fermentation patterns *in vitro* of glucose, cellobiose, microcrystalline cellulose and NDF separated from alfalfa hay in the adult rabbit. *Animal Feed Science and Technology*, 162, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.09.008>