



VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v.v.i.
Praha Uhřetěves

METODIKA

Hodnocení stravitelnosti neutrálně-detergentní vlákniny ve výživě skotu

Autoři

Ing. Veronika Koukolová, Ph.D.

Ing. Petr Homolka, Ph.D.

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves
Oddělení výživy a krmení hospodářských zvířat

Oponenti

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.

Děkan Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Ing. Juraj Saksún

Ministerstvo zemědělství České republiky
Odbor živočišných komodit

Metodika vznikla jako součást řešení výzkumného záměru MZe ČR
(MZE0002701403).

2008

ISBN 978-80-7403-016-1

I. CÍL METODIKY A DEDIKACE

Hypotéza metodiky

Metodika vychází z potřeby zdokonalovat a upřesňovat dosavadní systémy hodnocení krmiv. Hodnocení neutrálně-detergentní vlákniny (NDF) ve výživě přežvýkavců je důležitým kritériem pro zhodnocení:

- nutriční kvality objemné píce (krmiva, krmné dávky),
- fyziologické využitelnosti krmiva
- kinetiky trávicího traktu přežvýkavců.

Cíl metodiky

1. Stanovit tři nejdůležitější parametry popisující profil degradovatelnosti neutrálně-detergentní vlákniny (NDF): parametr b (tj. parametr „potenciální stravitelnost“), parametr c (tj. parametr „rychlost degradace“), parametr DNDF (tj. parametr „absolutně stravitelná část NDF“).
2. Vypočítat parametr ED (tj. parametr „efektivní degradovatelnost“).
3. Vytvořit predikční rovnice pro výše uváděné parametry k ověření (standardizaci) *in vitro* metody testované na kanylovaných kravách metodou *in situ*.
4. Uvést poznatky této práce do praxe.

Dedikace metodiky

Metodika vznikla jako součást řešení výzkumného záměru MZe ČR (MZE0002701403).

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Úvod

Neutrálně detergentní vláknina (NDF) hraje významnou roli ve výživě přežvýkavců. Vláknina není chemicky přesně definovaná látka, je to směs látek sestávajících z celulózy, hemicelulózy a nestravitelných inkrustujících látek, zejména ligninu, kutinu, křemičitanů atd. (Zeman a kol., 2006). Obecně lze konstatovat, že optimální zastoupení vlákniny ve výživě přežvýkavců zabezpečuje mechanické nasycení zvířat, podporuje peristaltiku střev a motoriku bachoru, limituje příjem a stravitelnost krmiva (krmné dávky), (Zeman a kol., 2006).

Podle vzájemného poměru sacharidů (hemicelulózy, celulózy atd.) k ligninu se mění stravitelnost vlákniny, tedy využitelnost krmiva (krmné dávky). *In vivo* a *in situ* pokusy využívané ke stanovení koeficientů stravitelnosti živin a vyjádření kinetiky trávicího traktu jsou poměrně pracné a časově náročné. Proto efektivnějším řešením je neustálé vyvíjení a zlepšování časově i ekonomicky dostupnějších *in vitro* laboratorních metod.

Ve vlastním experimentu byly použity metody zahrnující chemické rozborů základních živin, *in vitro* enzymatickou metodu a *in situ* degradovatelnost NDF. Stanovení se uskutečnilo na vybraných souborech vzorků objemné píče.

2. Literární přehled

2.1. Sacharidy a jejich význam ve výživě přežvýkavců

Sacharidový komplex (vláknina) je jedním z nejvýznamnějších složek pícnin. Sacharidy obsažené v rostlinných krmivech jsou uloženy jednak v buněčných stěnách (tzv. hrubá vláknina, tvořená především celulózą, hemicelulózą a ligninem, který však po chemické stránce mezi sacharidy nepatří, a malým množstvím kutinu) a jednak v buněčné protoplazmě (zejména škrob a rozpustné sacharidy, převážně cukry) (Urban a kol., 1997).

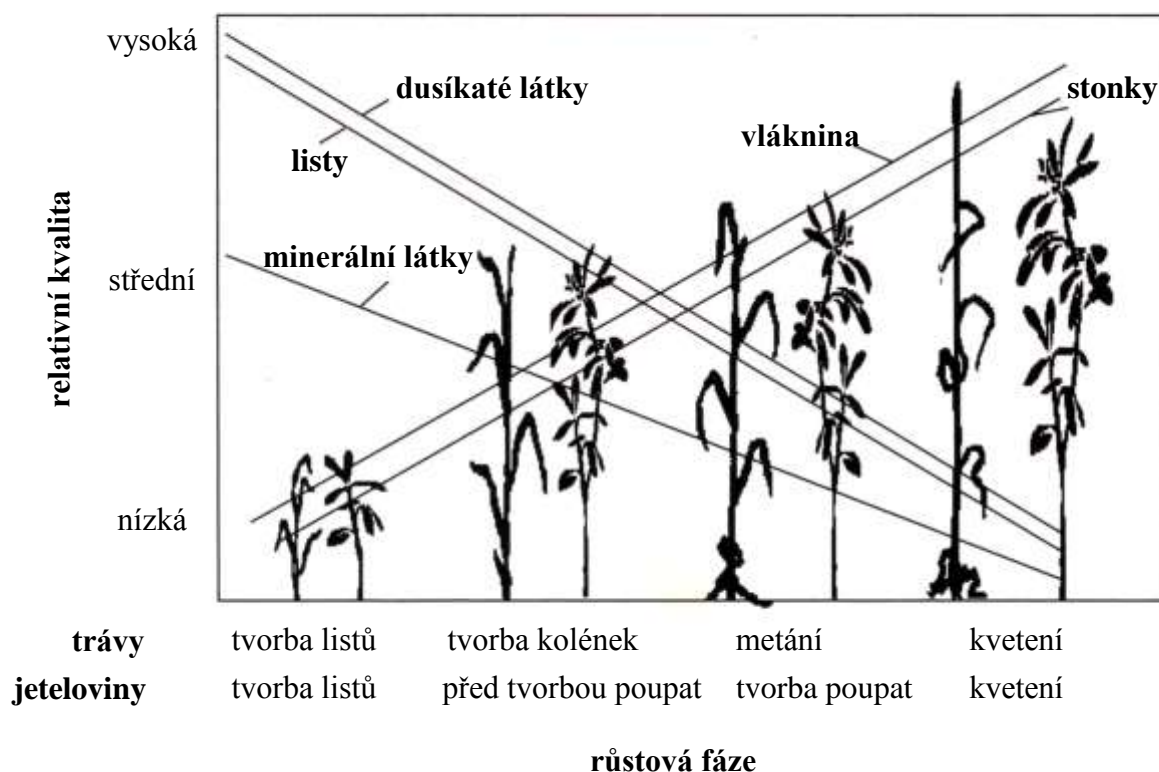
Nutriční hodnota píče u přežvýkavců závisí na poměru buněčného obsahu a buněčných stěn a na schopnosti bachorových mikroorganismů degradovat buněčné stěny rostlin a fermentovat dostupné sacharidy (Waldo, 1986). Toto je v podstatě určeno chemickým složením krmiva (Van Soest, 1994). Teoretické členění sacharidových frakcí podle Van Sauna a Koukala (2003) je uvedeno ve schématu 1.

Schéma 1. Dělení sacharidových frakcí (Van Saun a Koukal, 2003).

Veškeré sacharidy	
Nestrukturní sacharidy	Strukturní sacharidy (NDF)
a) Cukry	a) Hemicelulóza
b) Škroby	b) Acido-detergentní vláknina (ADF)
c) Neutrálně-detergentní rozpustná vláknina	- celulóza
- pektiny	- lignin
- fruktany	- mailard protein
- beta-glukany	

Hlavní funkcí NDF frakce v krmné dávce přežvýkavců je poskytovat energii pro mikrobiální syntézu, zajišťovat správnou činnost bачору a tím i zdravotní stav zvířat (Mertens, 1994; Eastridge, 2006). Avšak příliš vysoké množství NDF v krmné dávce může negativně omezit příjem krmiva zvířaty, neboť tato frakce krmiva pak převažuje v obsahu bачору. Vláknina ovlivňuje plnivost bачору – příjem krmiva je ovlivňován koncentrací přijaté vlákniny v krmné dávce spolu s kinetickou činností bачору (Mertens, 1994; Stensig a kol., 1994). Variabilitu využitelnosti vlákninové frakce v krmné dávce přežvýkavců lze tedy charakterizovat jako parametr závislý na celé řadě asociativních faktorů - botanickém druhu pícniny, vegetační fázi porostu, způsobu konzervace, apod. (obrázek 1). Proto je stanovení NDF prioritní chemickou analýzou užívanou k predikci příjmu píce (Van Soest, 1994).

Obrázek 1. Vliv vegetační fáze na příjem a stravitelnost píce podle Ball a kol., 2001.



2.2. Nutriční potřeba dojnic

Výživa dojnic významně ovlivňuje produkci bakteriální biomasy v bachoru, kvalitu bachorové fermentace, zdravotní stav a užitkovost zvířat.

Požadavky dojnic na živiny v krmné dávce. Optimální úroveň výživy dojnic je představována naplněním živinových potřeb bachorových mikroorganismů v podobě sacharidů, dusíkatých a minerálních látek a jednak doplněním toku mikrobiálních bílkovin a produktů fermentace v bachoru nedegradovatelnými složkami, které zajistí plnohodnotné naplnění nutričních potřeb dojnic. Při sestavování krmné dávky bychom měli maximálně podpořit pozitivní funkce bachorových mikroorganismů na jedné straně a na straně druhé minimalizovat fermentační ztráty (Kudrna a kol., 1998).

Požadavky dojnic na NDF v krmné dávce. Krmná dávka s optimální koncentrací strukturní vlákniny je významným činitelem, který rozhoduje o příjmu krmiva, fermentační činnosti bachoru, stravitelnosti živin a mléčné produkci dojnic (Zebeli a kol., 2006). Příjem sušiny je ovlivněn poměrem NFC:NDF krmné dávky (NFC = nestrukturní, rychle dostupné sacharidy - především škrob a cukry), (Yang a Beauchemin, 2006).

Příjem sušiny krmiva záleží na energetické potřebě dojnic a plnicím efektu předkládané krmné dávky (Allen, 2000). Tento plnicí efekt je úzce spojován se zastoupením NDF v sušině krmné dávky. Není-li NDF v krmné dávce zastoupena v potřebném množství a ve správné struktuře, lze předpokládat omezený příjem krmiva. Minimální stanovený obsah NDF pro krávy v první fázi laktace je mezi 27 až 30 % sušiny krmné dávky. Přitom minimálně 75 % z veškeré NDF v krmné dávce by mělo být dodáno pící. I přes tato doporučení je množství NDF v krmné dávce předmětem stálé diskuse, stejně jako negativní korelační vztah mezi obsahem ADF a stravitelností píce (Davis, 1992; cit. Urban a kol., 1997). Pro všechny dojnice v laktaci je doporučeno 19 až 21 % ADF ze sušiny krmné dávky, což je minimum nutné k zachování řádné činnosti bachorového systému a normální tučnosti mléka, a to za předpokladu, že ADF je dodávána pící, která splňuje kritéria efektivního zdroje vlákniny (NRC, 2001). V tabulce 1 jsou uvedeny doporučované obsahy živin podle McCullough (1994), cit. Kudrna a kol. (1998).

Tabulka 1. Optimální úroveň živin v krmné dávce dojníc v průběhu mezidobí (zdroj: McCullough, 1994; cit. Kudrna a kol., 1998).

Živiny v %	Období laktace			Období stání na sucho	
	Ranné	Střední	Pozdní	Počátek	Před otelením
NL	17-20	15-17	14-15	12	14-15
Degradovatelné NL	60-65	62-67	65-78	65-70	62-68
Nedegradovatelné NL	22-40	33-37	30-36	30-35	32-38
Rozpustné NL (% z NL)	30-35	30-37	30-50	32-35	31-34
ADF	19-21	20-23	21-24	26-30	25-28
NDF	30-33	30-36	34-40	40-45	37-40
NDF z píče	20-24	20-25	21-25	32-36	28-33
NSC	30-35	32-37	32-38	32-40	31-38
Tuk	5-7,5	5-6	3-5	3-4	3-5
NEL (MJ/kg)	7-7,5	6,8-7,3	6,5-7	5,4-5,9	6-6,5

ADF = acido-detergentní vláknina, NDF = neutrálně-detergentní vláknina, NEL = netto energie laktace, NL = dusíkaté látky, NSC = nestrukturní sacharidy.

2.3. Vliv NDF na kvalitu mléka

Optimální podmínky pro bachorovou fermentaci jsou vedle dalších faktorů předpokladem produkce kvalitního mléka. Podíl jednotlivých složek mléka není konstantní, k největším změnám dochází v obsahu mléčného tuku. Menší změny jsou v obsahu bílkovin a k nejmenším dochází v obsahu laktózy a většiny minerálních látek v mléce obsažených. Hlavním prekursorem mléčného tuku v mléčné žláze je kyselina octová, která je tvořena v bachoru ze strukturních sacharidů v průběhu bachorové fermentace. Dalšími prekursory mléčného tuku jsou kyselina máselná a hydroxymáselná. Pro syntézu mléčného tuku jsou využívány i mastné kyseliny obsažené v krmivech – jadrná krmiva, siláže, senáže (Kudrna a kol., 1998).

Efektivní NDF (eNDF). Efektivnost NDF je ovlivňována velikostí částic, stupněm lignifikace, hydratací buněčných stěn a zastoupením v jednotlivých skupinách krmiv (Zeman a kol., 2006). Dostatečné množství efektivní vlákniny pozitivně stimuluje produkci slin, žvýkání, přežvykování a udržování optimálních hodnot pH bachorového obsahu - tím vším zabraňuje poruchám bachorové fermentace (Mertens, 2000).

NDF obsažená v jemně rozmělněných krmivech ztrácí svůj stimulační efekt (Zeman a kol., 2006). Vysoký podíl jemně mletých a kašovitých krmiv negativně ovlivňuje tvorbu kyseliny octové, a tím i tvorbu mléčného tuku (Kudrna a kol., 1998). Se vzrůstající velikostí částic jednotlivých krmiv stoupá i jejich efektivita mechanické stimulace. Pro zajištění dobré motoriky bachoru a přežvykování by měla směsná krmná dávka pro dojnice obsahovat minimálně 21 % eNDF nebo 75 % NDF z píce. Při posuzování zastoupení eNDF v krmné dávce je třeba vzít v úvahu i snížení velikosti částic při přípravě směsné krmné dávky a

velikost částic v nepřijatém zbytku krmné dávky. Selektivní příjem jemnějších podílů krmné dávky může být příčinou vzniku bachorových acidóz (Zeman a kol., 2006).

Jako mezní hranice velikosti částic krmiva podporující ještě přežvykování se uvádí 19 mm. Částice pod 12 mm mají pouze malý vliv na stimulaci žvýkání, a to i v případě, že obsahují dostatečné množství vlákniny. Tato hraniční hodnota (12 mm) byla zařazena i do americké normy NRC, (Zeman a kol., 2006).

Yang a Beauchemin (2006) porovnávali vliv délky řezanky kukuřičné siláže a obsahu eNDF ve vztahu k mléčné produkci (tabulka 2). Mléčná užitkovost byla nižší ($P < 0,08$) u krátké řezanky než u střední a dlouhé řezanky. Produkce mléčného tuku a mléčné bílkoviny nebyla ovlivněna eNDF, pouze obsah laktózy měl narůstající tendenci ($P < 0,10$) pouze u střední řezanky (tabulka 2).

Tabulka 2. Vliv velikosti fyzikálně efektivní vlákniny (eNDF) na mléčnou užitkovost a složení mléka (zdroj: Yang a Beauchemin, 2006).

	Délka řezanky směsné krmné dávky			SE	Efekt	
	Dlouhá ¹	Střední ²	Krátká ³		Lineární	Kvadratický
Užitkovost, kg mléka/den						
Nádoj	32,1	32,4	31,5	2,4	0,08	0,04
4% FCM	30,1	30,7	29,5	2,7	NS	NS
Mléčný tuk						
%	3,65	3,66	3,65	0,20	NS	NS
kg/d	1,15	1,18	1,13	0,13	NS	NS
Mléčná bílkovina						
%	3,30	3,23	3,24	0,13	NS	NS
kg/d	1,04	1,04	1,01	0,08	NS	NS
Laktóza						
%	4,37	4,47	4,44	0,15	NS	0,10
kg/d	1,41	1,45	1,40	0,14	NS	0,06
Zastoupení v % sušiny kukuřičné siláže (kukuřičná siláž tvořila 45,8 % směsné krmné dávky)						
NDF	49,3	46,3	47,8	1,5	NS	0,08
eNDF _{1,18cm}	45,0	41,8	39,0	2,2	0,01	NS
Směsná krmná dávka (% sušiny píce)						
NDF píce	71,4	69,3	70,2	2,2	NS	NS

NS = nesignifikantní průkaznost ($P \geq 0,15$), SE = směrodatná odchylka, ¹Dlouhá = délka řezanky 28,6 mm, ²Střední = délka řezanky 15,9 mm, ³Krátká = délka řezanky 4,8 mm.

2.4. Stravitelnost vlákniny

Stravitelná vláknina v bachoru je obvykle definována jako část přijaté vlákniny, která není vyloučena výkaly (Třináctý a kol., 2000). Délka pobytu vlákniny v bachoru dojnice může činit 30 až 45 hodin (Varga a Whitsel, 1991). Vláknina obsahuje nestravitelné frakce a více potenciálně stravitelných frakcí, každá z nich je degradována vlastní rychlostí. Jak bylo výše

uvedeno, proces trávení sacharidů zahrnuje hydrolyzu polysacharidů a následnou konverzi monosacharidů do těkavých mastných kyselin, fermentačních plynů a tepla. Rychlost hydrolyzy je základním faktorem ovlivňujícím trávení vlákniny v bachoru a závisí na rychlosti pronikání enzymů, které degradují stěny buněk, hluboko do lignino-polysacharidového komplexu. Rozsah trávení vlákniny závisí na velikosti nestravitelné frakce a výsledku procesu degradace spolu s pasáží tráveniny z bachoru. Interference mezi nestructurními sacharidy a trávením vlákniny byla již často sledována.

Nutriční hodnotu objemné píce ovlivňuje i botanická skladba porostu, která určuje obsah a složení buněčných stěn (Čerešňáková a kol., 2000). Obsah buněčných stěn, jejichž hlavními komponenty jsou celulóza, hemicelulóza a nesacharidový lignin (Deinum, 1973; Graham a Aman, 1991) mají vliv na trávení, respektive degradaci nerozpustné frakce objemných krmiv.

Na základě dlouhodobých *in vitro* nebo *in situ* inkubačních intervalů, může být frakce NDF rozdělena na dvě části: potenciálně stravitelnou NDF (DNDF) a nestravitelnou NDF (INDF). Potenciální stravitelnost NDF může být následně počítána jako poměr DNDF/NDF (Meyer a Mackie, 1986; Vanzant a kol., 1998).

Přestože INDF nepřispívá organismu energeticky (Traxler a kol., 1998) je definována jako tzv. „ideální nutriční jednotka“ stanovená po procesu degradace s predikovanou nulovou rychlostí degradace (Ellis a kol., 1999). Za hlavní faktor limitující stravitelnost píce je považován především lignin (Besle a kol., 1994; Van Soest, 1994). Lignin je prakticky nestravitelný, omezuje využitelnost ostatních složek buněčných stěn, čímž redukuje podíl potenciálně stravitelné vlákniny (Traxler a kol., 1998). Hodnocení nestravitelné frakce je tudíž rozhodujícím ukazatelem pro přesnost popisu kinetiky trávicího traktu, přestože tuto frakci nejsou zvířata schopná trávit, ale tvoří podstatu charakteristiky krmiva (Mertens, 1993).

2.5. Metody predikce stravitelnosti krmiv

Metody predikce stravitelnosti krmiv jsou založeny na korelaci stravitelnosti organické hmoty s konkrétní složkou krmiva (lignin, vláknina, acido-detergentní vláknina a neutrálně-detergentní vláknina). Hlavním společným znakem metod predikujících stravitelnost krmiv je napodobení trávicích pochodů živého zvířete.

Aktuálními metodami ke stanovení stravitelnosti jsou:

1. *in vivo* bilanční metody - metoda *in vivo* vyjadřuje úbytek živin, ke kterému dojde během průchodu krmiva trávicím ústrojím (Schiemann, 1981; Vencl, 1985),

2. *in situ* či *in sacco* metody – tyto metody se využívají ke stanovení degradovatelnosti živin v bachoru (Ørskov a McDonald, 1979),
3. *in vitro* metody – na tyto laboratorní metody je v současnosti zaměřena pozornost pro jejich využitelnost v běžných laboratořích (Tilley a Terry, 1963; Setälä a kol., 1984; Antoniewicz a kol., 1992; Tománková a Homolka, 1995; Koukolová a kol., 2004).

Při použití *in vitro* metod odhadu stravitelnosti je nezbytná jejich kalibrace se stanovením stravitelnosti metodami *in vivo* charakteru.

In vivo stravitelnost krmiv. *In vivo* stravitelnost je běžně zjišťovaná zdánlivá (bilanční) stravitelnost bez korekce na endogenní ztráty (Schiemann, 1981; Míka a kol., 1997).

Základní metodou je stanovení stravitelnosti krmiv v bilančních *in vivo* pokusech na skopcích (Vencl, 1988) i na jednotlivých kategoriích skotu (Míka a kol., 1997). Předpokladem provádění pokusů touto klasickou metodou je příjem definovaného množství krmiva a kvantitativní odchyt výkalů a moče v průběhu hlavního bilančního období (Vencl, 1985).

Zvířata musí být předem navyklá na bilanční ustájení a zařízení k odchytu výkalů a moče a denní režim bilanční stáje (Schiemann, 1981; Míka a kol., 1997). Proto se vlastní pokus skládá z přípravné a hlavní periody pokusného období. Po navykačním období (návyku zvířat na pokusné prostředí i krmnou dávku) je dospělým skopcům zkrmováno testované krmivo v přesně odváženém množství. Poté je zjišťováno přijaté množství krmiva a množství vyloučených výkalů. Následuje stanovení živin v krmivech a stanovení nestravitelných živin ve výkalech, vyjádří se koeficienty stravitelnosti organických živin a energie (Vencl, 1988).

Hodnota korelačního koeficientu závislosti mezi stravitelností *in vivo* a jednotlivými metodami stanovení stravitelnosti je důležitým kritériem pro posouzení jednotlivých testovaných metod sloužících k predikci stravitelnosti krmiva (Vencl, 1988).

Koeficient *in vivo* stravitelnosti je dán vztahem (Schiemann, 1981):

$$\text{Zdánlivá stravitelnost} = ((P - V)/P) \times 100$$

$$\text{Skutečná stravitelnost} = ((P - (V - E))/P) \times 100$$

Kde: P = příjem (živiny, sušiny, organické hmoty a energie), V = množství vyloučené ve výkalech, E = endogenní vylučování

In situ (in sacco) stravitelnost krmiv. Stanovení stravitelnosti *in situ* (trávení vzorků píce v nylonových sáčcích přímo v bachoru) se děje v podmínkách blízkým *in vivo*. Důležitá je standardizace metody.

In vitro stravitelnost krmiv. K predikci procesu bachorové degradovatelnosti se stále hledají a zdokonalují *in vitro* laboratorní metody (Tománková a Kopečný, 1995).

In vitro stravitelnost lze v podstatě stanovit na základě (Míka a kol., 1997):

1. vážení nerozpustného zbytku po působení enzymů (dodaných do trávicího média přímo či prostřednictvím mikrobiálního inokula),
2. propočtu podle objemu plynu vytvořeného při fermentaci vzorku *in vitro* s bachorovou šťávou,
3. chemického stanovení některých složek buněčných stěn a za použití predikčních rovnic,
4. přímé predikce pomocí reflexní spektroskopie v blízké infračervené oblasti (near infrared reflectance spectroscopy, NIRS).

Údaj *in vitro* stravitelnosti se používá k sestavování krmných dávek a k predikci odezvy na užitkovost. Avšak *in vitro* metody mohou způsobit odchylku od skutečné *in vivo* hodnoty, proto je nezbytné kalibrovat přesnost *in vitro* hodnot s hodnotami *in vivo* (Míka a kol., 1997). Kalibrace je požadována z důvodu prokázaných rozdílů mezi nativními enzymy bachorového inokula a průmyslovými enzymy v substrátové specifitě a vedlejší aktivitě celulózového komplexu (Homolka, 1994). Tato skutečnost je důvodem odvozování regresních rovnic závislosti k hodnotám *in vivo* získaných v bilančních pokusech (Tománková a Homolka, 1997).

Metody používající inokulum. Nejrozšířenější laboratorní metodou používající inokula je metoda Tilley a Terry (1963) a její modifikace ve více či méně zdařilých obměnách. Tato metoda spočívá v inkubaci suchého pomletého vzorku (s jemností < 1 mm) se zředěným McDougallovým pufrem (McDougall, 1948) a bachorovou šťávou (24 či 48 hodin za občasného protřepávání) a následně s okyseleným roztokem proteolytického enzymu (pepsinu). Metoda se musí kalibrovat na referenční vzorky, u nichž jsou známé hodnoty stanovené *in vivo*. Pak je použitelná v poměrně širokém spektru vzorků objemné píče a výsledky jsou standardně přesné. Avšak její nevýhodou je závislost na chirurgicky uzpůsobených zvířatech (bachorová kanyla) a kolísání aktivity bachorové šťávy ze dne na den. Kolísání aktivity se pronikavě snížilo, pokud se první fáze fermentace prodloužila ze 48 na 72 hodin (Pozdíšek, 1999). Podle autorů Shaer a kol. (1987) a Míka a kol. (1997), lze bachorovou šťávu pro trávení vzorků s úspěchem nahradit suspenzí ovčích výkalů, neboť byla prokázána výborná korelace takto stanovených hodnot s hodnotami *in vivo*.

Poměrně široce uplatňovaná metoda tzv. „umělého bachoru“ (Lampeter, 1970) je srovnatelně přesná s Tilley a Terry metodou (TT), přestože vyžaduje tři opakování oproti dvěma opakováním u TT metody) (Míka, 1985).

Gazometrické metody používající inokulum. Potenciální stravitelnost krmiva může být také predikována na základě analýzy měření množství vytvořeného plynu po inkubaci krmiva v prostředí inokula (Pozdíšek, 1999; Huhtanen a Hristov, 2001). Huhtanen a Hristov (2001) zjistili vysoký korelační vztah ($r = 0.94$) u stanovení potenciální stravitelnosti NDF mezi metodami nylon bag (12 denní inkubace) a gazometrickou metodou (72 hodinová inkubace). Podle těchto autorů může tato metoda být sensitivní na variabilitu použitého inokula.

Vlastní zachycení a měření objemu uvolňovaných plynů v definovaných podmínkách (teplota 39 °C) není technicky jednoduchou záležitostí. V Německu jsou k tomuto účelu používány skleněné „pístové pipety“ s kalibrovaným objemem na 100 ml. Tyto funkční jednotky jsou umístěny v termostatu, usazeny do pomalu rotujícího karuselu, který umožňuje gravitační promýchávání reagentů. Ve Francii umísťují stejná zařízení ve vodní lázni a to ve svislé poloze. Správné zjišťování objemu uvolňovaného plynu je do značné míry závislé na jeho tlaku a teplotě. V současné době na používaných zařízeních je nesnadné zabezpečit eliminování řady faktorů, které mohou nepříznivě ovlivňovat přesnost zjišťovaných objemů plynů a tím i úroveň přesnosti konečných výsledků stanovení (například v důsledku nižší specifické hmotnosti se testované vzorky hromadí na hladině kultivačního media a i další nedostatky). S vědomím těchto nepřesností byl v České republice navržen a vyvinut ve VÚCHS Rapotín prototyp nového zařízení „Vitrogest“, jímž je umožněno průběžné sledování objemu uvolňovaných plynů během kultivace vzorků s bachorovou tekutinou při konstantní teplotě 38.5 až 39.5 °C a tlaku rovnajícímu se atmosférickému (Pozdíšek, 1999).

Metody používající enzymatické preparáty. Značná pozornost je také věnována enzymatickým metodám, protože stanovení stravitelnosti krmiv na kanylovaných zvířatech se stává zdlouhavou a poměrně technicky náročnou metodou, kterou nelze realizovat ve všech laboratořích (Tománková a Homolka, 1995). Metody tohoto charakteru běžně využívají komerční enzymy či enzymy bachorové mikroflóry (Tománková a Kopečný, 1995). Tyto metody vyžadují oproti předchozí metodě opačné pořadí fáze proteolytické a celulolytické, aby následný účinek celuláz (*Basidiomycetes*, *Trichoderma viridae* aj.) byl dostatečný. Alternativně se k nabobtnání a zbavení vzorku dusíkatých látek používá krátkodobé povaření ve slabém roztoku neutrálního tenzidu. Vzorky obsahující větší množství škrobu vyžadují před extrakcí neutrálním tenzidem či proteolytickým enzymem ošetření vhodnou

amyloglukosidázou. Tyto metody taktéž vyžadují kalibraci na hodnoty *in vivo*, zvláště u vzorků přestarlé píce, směsných vzorků, atypických vzorků apod. (Pozdíšek, 1999).

Chemické metody. Traxler a kol. (1998) ve své práci uvádí výsledky *in vitro* stravitelnosti sušiny a NDF, které predikoval z obsahu NDF, ADF, ligninu a poměrů ligninu/NDF a ligninu/ADL. Obecným závěrem je, že chemické metody jsou méně přesné ve srovnání s biologickými či enzymatickými metodami (Míka a kol., 1997; Traxler a kol., 1998 a Harazim a kol., 1999).

Metoda NIRS. Predikce pomocí NIRS metody je relativně přesná (SE obvykle kolem 2,5 %, $r = 0,8$) v širokém rozpětí hodnot vzorků, pokud se jedná o stravitelnost sušiny. Jelikož citlivost metody NIRS vůči popelovinám není obecně dobrá, predikce stravitelnosti organické hmoty (stravitelnosti organické hmoty vztažené k sušině) bez této adjustace by se neměla používat. Pomocí NIRS lze hodnotit rovněž i další vlastnosti testovaného materiálu (Pozdíšek, 1999).

3. Experimentální část metodiky

3.1. Materiál a metodika

Pokusný materiál. Profil degradovatelnosti neutrálně-detergentní vlákniny byl studován u 25 vzorků objemné píce, tj. 12 vzorků pastevních porostů (10 vzorků jetelotrav a 2 vzorky jílku vytrvalého) a 13 vzorků jetelotravních siláží.

Metodický postup. V této práci bylo primárním úkolem vyhodnotit a porovnat vytvořené predikční rovnice, které jsou nezbytnou součástí standardizace systému hodnocení krmiv a zároveň jsou způsobem vyjádření trávicích pochodů v těle přežvýkavců. Sestavené predikční rovnice vycházely z hodnot všech rozborů; hodnot *in vitro* stravitelnosti organické hmoty a *in vitro* stravitelnosti NDF; dopočtené *in vivo* stravitelnosti organické hmoty a obsahu NDF frakce.

Stanovení základních živin. Původní vzorek byl analyzován metodickými postupy AOAC (1990) na obsah sušiny, popele, dusíkatých látek (NL), tuku, neutrálně-detergentní vlákniny (NDF), acido-detergentní vlákniny (ADF) a acido-detergentního ligninu (ADL).

In situ degradovatelnost. Parametry bachorové degradovatelnosti NDF (parametr *b* „potenciální stravitelnost“ a parametr *c* „rychlost degradace“) a efektivní bachorová degradovatelnost NDF byly hodnoceny metodou *in situ* (velikost pórů nylonových sáčků byla 37 mikronů) podle metodického postupu Hvelplund a Weisbjerg (2000). Usušený a namletý

materiál byl ve třech opakováních inkubován 2, 4, 8, 16, 24, 48, 96, 168 a 504 hodin v bachoru tří suchostojných kanylovaných holštýnských krav. Degradovatelnost NDF byla upravována 0 hodinovým inkubačním intervalem pro korekci na případný únik částec krmiva z původní navážky (nylonové sáčky byly propírány ve studené vodě v automatické pračce). Efektivní bachorová degradovatelnost NDF byla vypočítána pro výtokovou rychlost částic z bachoru $k = 0,02 \text{ h}^{-1}$ podle rovnic McDonalda (1981) a Ørskova a McDonalda (1981):

a) Rovnice zahrnující parametr lag time (lt) (McDonald, 1981): $ED = b \times (c / (c + k)) \times \exp^{-k \times lt}$

b) Rovnice nezahrnující parametr lt (Ørskov a McDonald, 1979): $ED = b \times (c / (c + k))$

Kde: ED = efektivní bachorová degradovatelnost NDF (%), b = nerozpustná, ale potenciálně degradovatelná frakce NDF (%), c = rychlost degradace frakce b (h^{-1}), exp = exponenciál

k = rychlost pasáže částic z bachoru (h^{-1}), lt = lag time (h)

In vitro stravitelnost. *In vitro* stravitelnost organické hmoty (OH) a *in vitro* stravitelnost NDF byla stanovena enzymatickou metodou. Dále byla vypočítána tzv. modifikovaná *in vitro* stravitelnost OH (Emod) podle vzorce: (navážka OH – reziduum NDF)/(navážka OH) (Koukolová a kol., 2004).

In vivo stravitelnost. *In vivo* stravitelnost OH vycházela ze stanovení *in vitro* stravitelnosti OH enzymatickou metodou (EOH): $in\ vivo = 0,260 + 0,658 \times EOH$ podle Søegaard a kol. (2001).

Predikční rovnice. Ke zpracování získaných dat byla použita korelační, vícenásobná regresní analýza a validační test za použití statistického programu SAS (SAS Institute, 2000).

3.2. Výsledky a diskuse

Průměrné hodnoty základních živin (tabulka 3) byly 98,3 g/kg pro popel; 180,2 g/kg pro NL; 386,2 g/kg pro NDF; 245,6 g/kg pro ADF a 23,7 g/kg pro ADL. Dále v tabulce 3 jsou také uvedeny průměrné hodnoty pro *in vitro* stravitelnost OH a NDF, která byla stanovena enzymatickou metodou. *In vitro* stravitelnost OH a NDF se pohybovala od 0,565 do 0,911 a od 0,389 do 0,883, respektive. Se zvyšujícím se obsahem NDF stravitelnost OH a NDF prokazatelně klesala ($P < 0,0001$). V grafu 1 je pro doplnění těchto průměrů zaznamenána variabilita výsledků s minimálním a maximálním rozpětím souboru objemných krmiv. Podobné hodnoty pro objemnou píci jsou uváděny autory Søegaard a kol., 2001; Sommer a kol., 1994; Van Soest, 1994.

Průměrné hodnoty úbytků NDF pro jednotlivé inkubační intervaly jsou zaznamenány v tabulce 4. NDF degradovatelnost ukázala velkou variabilitu. Podíl nestravitelné části NDF

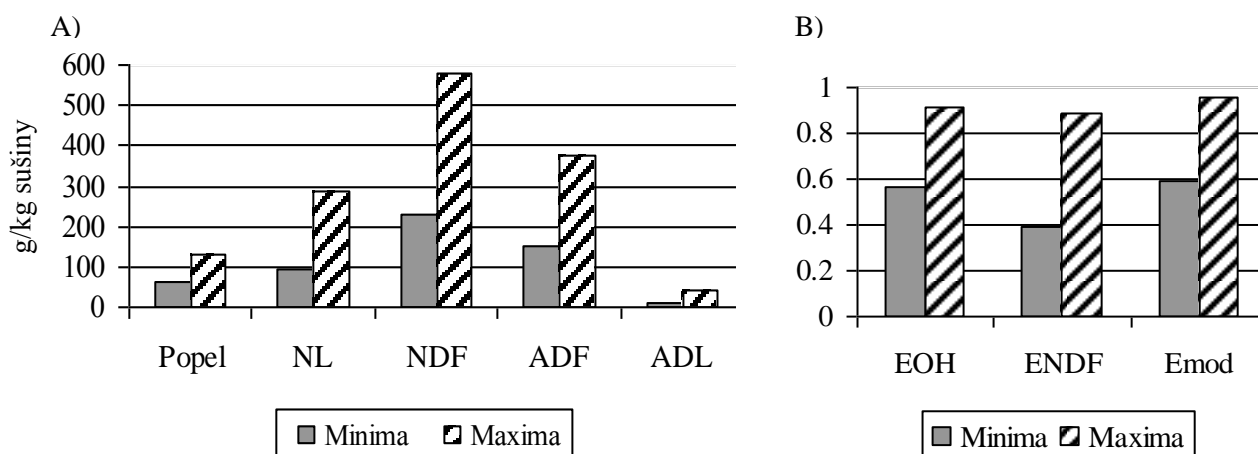
frakce (INDF) byl determinován pomocí dlouhodobého inkubačního intervalu 504 hodin odečtením procentické hodnoty od 100 %. Stravitelný podíl NDF frakce (DNDF), který byl hodnocen jako část NDF degradovaná po 21 dnech (504 hodinách) inkubování krmiva v bachoru, byl počítán jako $1 - \text{INDF}$. Dlouhodobé inkubační intervaly (168 a 504 hodin) byly použity podle autorů Hvelplund a Weisbjerg (2000). Podíl nestravitelné NDF (INDF) byl určen po 504 h inkubace metodou *in situ* a byl v rozmezí od 4,66 % do 24,65 %. Podobně kolísající variabilitu DNDF rovněž po 21 dnech (504 hodinách) *in situ* metody u vzorků píce (hodnoty od 0,590 do 0,900) determinoval Lund (2002).

Tabulka 3. Průměrné hodnoty chemických rozborů (g/kg sušiny) a *in vitro* stravitelnosti OH a NDF.

Chemický rozbor	Čerstvá píce			Silážovaná píce		
	minima	maxima	průměr	minima	maxima	průměr
Popel	64,5	122,4	92,8	73,0	132,9	103,3
NL	145,0	289,0	204,3	94,0	207,0	158,0
NDF	229,3	446,4	329,9	303,2	576,8	438,1
ADF	149,1	255,8	202,0	191,9	374,4	285,7
ADL	8,4	44,1	21,4	13,1	38,7	25,8
EOH	0,661	0,911	0,821	0,565	0,811	0,721
ENDF	0,475	0,883	0,736	0,389	0,710	0,561
Emod	0,736	0,953	0,869	0,593	0,847	0,753

ADF = acido-detergentní vláknina, ADL = acido-detergentní lignin, ENDF = enzymatická *in vitro* stravitelnost NDF, EOH = enzymatická *in vitro* stravitelnost OH, Emod = stravitelnost OH vypočtená ze zbytku NDF po ENDF, NDF = neutrálně-detergentní vláknina, NL = dusíkaté látky, OH = organická hmota.

Graf 1. Minimální a maximální rozpětí hodnot chemických rozborů (graf A) a *in vitro* stravitelnosti OH a NDF (graf B).



ADF = acido-detergentní vláknina, ADL = acido-detergentní lignin, ENDF = enzymatická *in vitro* stravitelnost NDF, EOH = enzymatická *in vitro* stravitelnost OH, Emod = stravitelnost OH vypočtená ze zbytku NDF po ENDF, NDF = neutrálně-detergentní vláknina, NL = dusíkaté látky, OH = organická hmota.

Tabulka 4. Průměrné hodnoty *in situ* degradovatelnosti NDF v jednotlivých inkubačních intervalech.

Inkubační intervaly	Čerstvá píče			Silážovaná píče		
	minima	maxima	průměr	minima	maxima	průměr
						(%)
2 h	4,86	15,10	10,50	0,02	13,05	4,60
4 h	9,88	40,25	21,97	2,84	14,99	8,54
8 h	26,85	72,29	48,70	12,16	44,52	26,80
16 h	31,22	77,94	55,48	21,26	55,82	37,22
24 h	49,08	84,96	69,67	30,64	70,99	52,16
48 h	66,32	92,54	83,70	47,44	89,13	75,13
96 h	71,96	94,63	87,15	66,56	91,73	82,39
168 h	75,00	95,46	88,96	71,50	93,70	85,48
504 h	75,35	95,34	89,56	77,61	94,96	87,95

V tabulce 5 jsou uvedeny minimální, maximální a průměrné hodnoty parametrů vystihujících efektivní degradovatelnost NDF (ED) čerstvé a silážované píče, tj. parametr *b* (nerozpustná, ale potenciálně degradovatelná frakce NDF), parametr *c* (rychlost degradace frakce *b*) a parametr lag time (*lt*). K výpočtu ED byly použity rovnice nezahrnující *lt* (Ørskov a McDonald, 1979) a zahrnující *lt* (McDonald, 1981). ED byla zohledněna koeficientem pro výtokovou rychlost částic z bachoru $k = 0,02 \text{ h}^{-1}$. ED byla vypočítána z výsledků inkubačních intervalů 2, 4, 8, 24, 48, 96 a 168 hodin. V důsledku zmírnění degradace NDF u několika vzorků sledovaného souboru v inkubačním intervalu 16 h (hodnoty nejsou tabelovány) nebyly tyto hodnoty NDF degradovatelnosti do budoucích kalkulací jednotlivých parametrů profilu degradovatelnosti začleněny. Příčinou zmírnění degradační křivky v tomto čase byla pravděpodobně odlišná doba vkládání nylonových sáčků do bachoru (sáčky byly vkládány v 16:00 hodin odpoledne, zatímco ostatní inkubační intervaly byly zahájeny klasicky v 8:00 hodin ráno). Tento rozdíl v rámci zvolených inkubačních intervalů lze interpretovat tak, že v odpoledních inkubačních intervalech bylo krmivo pomaleji degradováno zřejmě méně intenzivní mikrobiální aktivitou, která se mění v průběhu 24 hodin (Cone a kol., 1989; Sova a kol., 1990). Hodnoty rychlosti degradace NDF frakce (*c*) se pohybovaly od 0,022 do 0,150 za hodinu a potenciálně degradovatelná frakce NDF (*b*) kolísala od 0,725 do 0,939. Zvyšující se obsah buněčných stěn (NDF) měl obecně za následek prodlužující se dobu nástupu procesu degradace, tj. lag time (*lt*), stejně tak uvádí Čerešňáková a kol. (2000). Přesto hodnoty *lt* nebyly do predikčních výpočtů konkrétních parametrů profilu degradovatelnosti NDF zahrnuty, protože časová prodleva *lt* trvala v průměru pouze do 1 hodiny (minimální hodnota byla 0 hodin, maximální hodnota *lt* byla až 4,5 hodiny), proto model pro výpočet parametrů

profilu degradovatelnosti nezahrnoval lt . Hodnoty parametru b počítané bez časové prodlevy lt se v podstatě nelišily od hodnot parametru b počítaného s lt (tabulka 5).

Tabulka 5. Hodnoty parametrů efektivní degradovatelnosti NDF.

Parametr	Čerstvá píče			Silážovaná píče		
	minima	maxima	průměr	minima	maxima	průměr
Bez parametru lag fáze						
b^1	0,725	0,939	0,873	0,738	0,932	0,858
c (h^{-1}) ²	0,045	0,150	0,083	0,022	0,062	0,041
ED2 ³	0,648	0,805	0,694	0,390	0,704	0,572
DNDF ⁴	0,754	0,953	0,896	0,776	0,950	0,880
S parametrem lag fáze						
lt (h) ⁵	0	1,8	0,7	0	4,5	1,3
b	0,725	0,929	0,867	0,733	0,919	0,848
c (h^{-1})	0,050	0,224	0,104	0,023	0,075	0,047
ED2	0,535	0,807	0,696	0,390	0,709	0,574

¹ nerozpustná, ale potenciálně degradovatelná frakce NDF

² rychlost degradace frakce b

³ efektivní bachorová degradovatelnost NDF počítaná pro výtokovou rychlost částic $0,02 h^{-1}$

⁴ NDF degradovatelnost po 504 h *in situ* inkubaci, tj. absolutně stravitelná část NDF

⁵ parametr lag fáze

Statistické zpracování výsledků tohoto pokusu je uvedeno v tabulkách 6, 7, 8. DNDF vzhledem k obsahu ligninu predikovali Conrad a kol. (1984) a Weiss a kol. (1992) v experimentech zabývajících se hodnocením kvality píče. Závislost stravitelnosti NDF na lignifikaci byla též prokázána mnohými autory (Jung a Vogel, 1986; Buxton a Russel, 1988; Sutton a kol., 2000; Traxler a kol., 1998). Náš experiment detekoval pozitivní korelační hodnoty vzájemně mezi frakcemi NDF, ADF a ADL. Z tabulky 7 je zřejmé, že ADL frakce je proměnou celého vlákninového komplexu, která nejvíce korelovala s DNDF, což se v souladu s výsledky práce Traxler a kol. (1998). ADL frakce pozitivně korelovala s poměrem ADL/NDF a negativně korelovala s *in vitro* hodnotami stravitelnosti NDF (ENDF) (tabulka 6). K obdobnému závěru došli ve svých studiích i Van Soest (1967) a Jung a Vogel (1986). Stravitelnost organické hmoty (EOH) ve vztahu k obsahu NDF, ADF a ADL je znázorněna v grafech 2, 3 a 4.

In vitro stravitelnost organické hmoty a *in vitro* stravitelnost NDF negativně korelovala s obsahem NDF frakce (se statistickou hladinou významnosti $P < 0,0001$), (tabulka 6). Toto signifikantní zjištění se v podstatě shoduje s výsledky ostatních studií zabývajících se hodnocením *in situ* a *in vitro* metod (Valentin a kol., 1999; Allen, 2000). Tito autoři

poukazují na obsah NDF jakožto na hlavní faktor limitující kvalitu píce. Zvyšující se *in vitro* stravitelnost NDF na úkor poklesu obsahu NDF potvrdili též Weiss a kol. (1992).

Frakce *b* nejvíce korelovala se stravitelnou NDF (DNDF), ADL a poměrem ADL/NDF a frakce *c* s *in vitro* ENDF stravitelností, NDF a ADF. Z toho je patrné, že potenciální stravitelnost NDF (*b*) je nejvíce korelována s lignifikací, kdežto rychlost degradace frakce NDF (*c*) se stravitelností krmiva (tabulka 7).

Stravitelnost OH vypočtená z reziduálního obsahu NDF po analýze enzymatickou metodou (dále jako modifikovaná *in vitro* stravitelnost OH; Emod) zřetelně korelovala ($r = 0,99$) s běžně determinovanou stravitelností OH (ENDF) se statistickou významností $P < 0,0001$ (tabulka 6).

Výsledky vícenásobné regresní analýzy predikčních rovnic parametrů degradovatelnosti NDF (*b*, *c*, DNDF) jsou uvedeny v tabulce 8. První set predikčních rovnic byl založen na všech laboratorních analýzách, tj. *in vitro* stravitelnosti OH (EOH), *in vitro* stravitelnosti NDF (ENDF) a chemických rozbořech základních živin. Avšak všechny tyto rozbořby nebudou vždy a ve všech laboratořích realizovatelné, proto druhý set predikčních rovnic vycházel už jen z *in vitro* stravitelnosti OH (EOH) a chemických rozbořů základních živin. Třetí set predikčních rovnic se skládal pouze z obsahu NDF frakce a *in vivo* stravitelnosti OH predikované enzymatickou metodou jako: $in\ vivo = 0,260 + 0,658 \times EOH$ podle Søegaard a kol. (2001). Prostým důvodem volby této třetí varianty predikčních rovnic byla skutečnost, že *in vivo* stravitelnost OH a obsah NDF frakce jsou zdrojem informací dostupných ve většině krmivářských tabulek.

Predikční rovnice parametru *b*, parametru *c* a DNDF vycházející z hodnot všech rozbořů byly popsány koeficienty determinace 0,87, 0,83 a 0,88, respektive. Rovnice založené na *in vitro* stravitelnosti OH a chemických rozbořech byly predikovány hodnotami 0,83, 0,85 a 0,83 pro *b*, *c* a DNDF, respektive. Rovnice vycházející pouze z obsahu NDF a *in vivo* stravitelnosti OH byly schopny charakterizovat *b*, *c* a DNDF koeficienty determinace kolem 0,80; tj. parametr *b* 0,78 (R^2), parametr *c* 0,81 (R^2) a parametr DNDF 0,79 (R^2).

Tabulka 6. Korelační koeficienty vybraných proměnných (chemické rozborů a *in vitro* stravitelnost OH a NDF).

	NDF	ADF	ADL	ADL/NDF	NL	EOH	ENDF
ADF ¹	0,88						
ADL ¹	0,63	0,78					
ADL/NDF ^{1,2}	0,19	0,44	0,87				
NL ¹	-0,41	0,35	-0,12	0,11			
EOH	-0,86	-0,86	-0,76	-0,45	0,55		
ENDF	-0,70	-0,70	-0,64	-0,39	0,66	0,93	
Emod	-0,87	-0,85	-0,69	-0,35	0,61	0,99	0,95

¹g/kg sušiny

²poměr ADL/NDF

ADF = acido-detergentní vláknina, ADL = acido-detergentní lignin, ENDF = enzymatická *in vitro* stravitelnost NDF, EOH = enzymatická *in vitro* stravitelnost OH, Emod = stravitelnost OH vypočtená ze zbytku NDF po ENDF, NDF = neutrálně-detergentní vláknina, NL = dusíkaté látky, OH = organická hmota.

Pozn. “tučné“ korelační koeficienty byly stanoveny se statistickou významností $P < 0,0001$

 Tabulka 7. Korelační koeficienty parametrů degradovatelnosti NDF (b^1 , c^2 , DNDF³) ve vztahu k chemickému složení a *in vitro* stravitelnosti OH a NDF.

Parametr	b	c	DNDF
c	0,49		
DNDF	0,99	0,52	
NDF ¹	-0,34	-0,78	-0,33
ADF ¹	-0,37	-0,78	-0,37
ADL ¹	-0,82	-0,55	-0,82
ADL/NDF ^{1,2}	-0,80	-0,13	-0,80
NL ¹	0,39	0,66	0,41
EOH	0,69	0,77	0,68
ENDF	0,75	0,86	0,76
Emod	0,66	0,83	0,66

¹g/kg sušiny

²poměr ADL/NDF

ADF = acido-detergentní vláknina, ADL = acido-detergentní lignin, b = potenciálně degradovatelná frakce, c = rychlost degradace frakce b (h^{-1}), DNDF = NDF degradovatelnost po 504 h *in situ* inkubacích, tj. absolutně stravitelná část NDF, Emod = stravitelnost OH vypočtená ze zbytku NDF po ENDF, ENDF = enzymatická *in vitro* stravitelnost NDF, EOH = enzymatická *in vitro* stravitelnost OH, NDF = neutrálně-detergentní vláknina, NL = dusíkaté látky, OH = organická hmota.

Pozn. “tučné“ korelační koeficienty byly stanoveny se statistickou významností $P < 0,05$

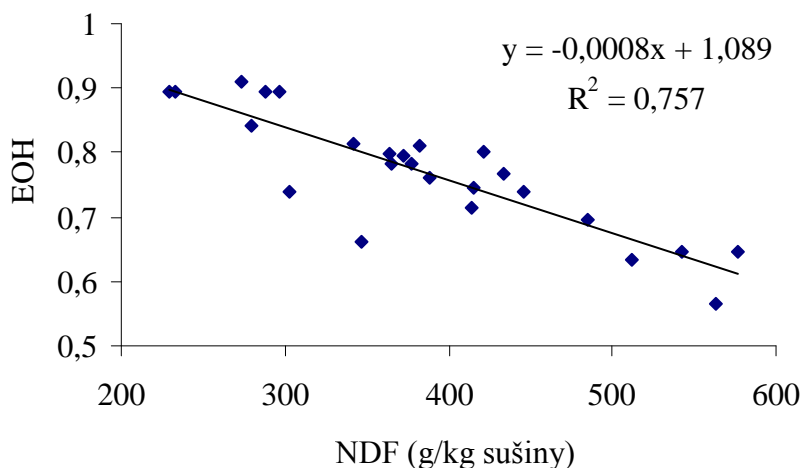
Tabulka 8. Vícenásobná regresní analýza predikčních rovnic parametrů degradovatelnosti NDF (b , c , DNDF). Jednotkami pro chemické analýzy jsou kg/kg sušiny a pro stravitelnost kg/kg.

Proměnná Y	Proměnné X a parametry regresní analýzy	R ²	RMSE
Zahrnující všechny rozборы			
b	$0,607+0,632ADF-4,29ADL+0,318ENDF$	0,87	0,024
c	$-0,116+0,512ADL/NDF+0,227ENDF$	0,83	0,013
DNDF	$0,253+0,402ADF-3,19ADL+0,672Emod+0,434(NDF \times NDF)$	0,88	0,021
Zahrnující <i>in vitro</i> stravitelnost organické hmoty a rozборы základních živin			
b	$0,404+0,943ADF-3,06ADL+0,551(EOH \times EOH)$	0,83	0,027
c	$0,458+0,430ADL/NDF-1,49EOH+1,16(EOH \times EOH)+0,167NL$	0,85	0,015
DNDF	$0,364-2,49ADL+0,630EOH+0,622(NDF \times NDF)$	0,83	0,024
Zahrnující pouze dopočítanou <i>in vivo</i> stravitelnost organické hmoty a frakci NDF			
b	$-0,542+0,860(NDF \times NDF)+1,66vivo$	0,78	0,031
c	$0,135-1,10NDF+1,20(NDF \times NDF)+0,210vivo$	0,81	0,014
DNDF	$-0,380+0,784(NDF \times NDF)+1,49vivo$	0,79	0,026

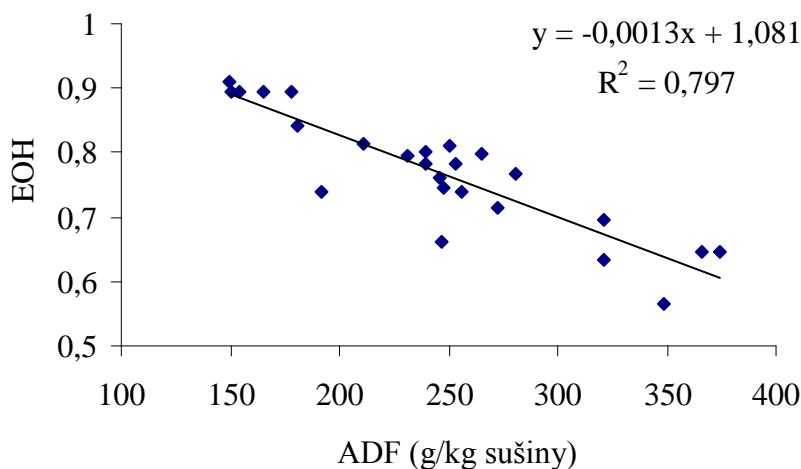
ADF = acido-detergentní vláknina, ADL = acido-detergentní lignin, b = potenciálně degradovatelná frakce, c = rychlost degradace frakce b (h^{-1}), DNDF = NDF degradovatelnost po 504 h *in situ* inkubacích, tj. absolutně stravitelná část NDF, ENDF = enzymatická *in vitro* stravitelnost NDF, EOH = enzymatická *in vitro* stravitelnost OH, Emod = stravitelnost OH vypočtená ze zbytku NDF po ENDF, NDF = neutrálně-detergentní vláknina, NL = dusíkaté látky, OH = organická hmota, *vivo* = *in vivo* stravitelnost OH hmoty predikovaná *in vitro* enzymatickou metodou.

R² = koeficient determinace

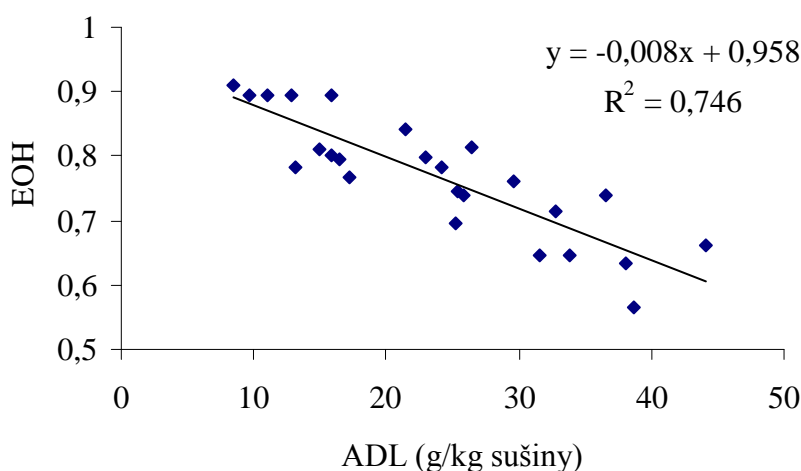
RMSE = střední kvadratická odchylka

 Graf 2. *In vitro* stravitelnost organické hmoty (EOH) ve vztahu k obsahu neutrálně-detergentní vlákniny (NDF).


Graf 3. *In vitro* stravitelnost organické hmoty (EOH) ve vztahu k obsahu acido-detergentní vlákniny (ADF).



Graf 4. *In vitro* stravitelnost organické hmoty (EOH) ve vztahu k obsahu acido-detergentního ligninu (ADL).



3.3. Závěr

Trávení v batoru je dynamický proces závislý na čase a vyplývající ze vzájemné konkurence mezi působením enzymatické činnosti mikroorganismů a výtokovou rychlostí částic krmiva z batoru. Hodnocení NDF je nezbytným ukazatelem pro hodnocení úrovně výživy skotu. Vzájemný poměr jednotlivých složek krmiva významně ovlivňuje využitelnost krmné dávky a v konečném důsledku i aktuální užitkovost zvířete.

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Hodnocení jednotlivých frakcí vlákniny (NDF, ADF a ADL) je nezbytným ukazatelem pro hodnocení úrovně výživy přežvýkavců. Vzájemný poměr jednotlivých složek krmiva významně ovlivňuje využitelnost krmné dávky a v konečném důsledku i aktuální užitkovost zvířete. **Hodnocení stravitelnosti NDF je proto doporučovanou součástí aplikace poznatků fyziologické podstaty trávicího ústrojí přežvýkavců do nových systémů hodnocení krmiv pro přežvýkavce.**

Výsledky této metodiky jsou uplatnitelné také v oblasti validace *in vitro* postupů, kterými lze určovat a zpřesňovat nutriční hodnotu objemných krmiv. *In situ* metody vyžadují časovou a technickou náročnost, proto je nezbytné rozvíjet méně náročné laboratorní postupy (zkvalitňovat chemické analýzy základních živin a metody *in vitro* stravitelnosti). Porovnávání a zdokonalování různých *in vitro* metod s metodami *in situ* dává možnost vzniku predikčních rovnic, výpočtů korelačních koeficientů a jednotlivých parametrů těchto rovnic poměrně s dostatečnou přesností. Stanovením parametrů degradovatelnosti NDF *in vitro* metodami a jejich ověření metodou *in situ* na kanylovaných kravách bylo potvrzeno, že pomocí běžných laboratorních postupů je možné predikovat konkrétní parametry bachorové degradovatelnosti NDF s prokazatelnou statistickou významností.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Výživa přežvýkavců významně ovlivňuje produkci bakteriální biomasy v bachoru, kvalitu bachorové fermentace, zdravotní stav a užitkovost zvířat. Hlavním zdrojem energie v krmné dávce u přežvýkavců jsou sacharidy. Množství, kvalita a vzájemný poměr jednotlivých strukturních i nestrukturních sacharidů v krmivu poskytuje důležitou informaci o zásobení zvířat vlákninou, která významně ovlivňuje využitelnost krmiva. Proto dělení sacharidů podle frakcí na neutrálně-detergentní vlákninu (NDF), acido-detergentní vlákninu (ADF) a acido-detergentní lignin (ADL) je součástí hodnocení a predikce příjmu krmiv přežvýkavci.

Metodika je určena organizacím, jejichž náplní je zjišťování nutriční hodnoty objemné píče (krmiv), posuzování kvality porostů objemné píče z hlediska využitelnosti živin hospodářskými zvířaty. **Záměrem metodiky je nejen snaha o standardizaci analytických postupů, které sledují využitelnost živin přežvýkavci, ale také potřebu aplikovat poznatky o stravitelnosti NDF do systému hodnocení krmiv pro přežvýkavce v ČR. Tyto znalosti jsou předpokladem chovatelské a produkční úspěšnosti prosperity chovů.**

Výsledky této práce jsou součástí nového severského systému NorFor, byly publikovány ve 2 vědeckých impaktovaných periodikách a prezentovány na konferencích.

V. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Allen M. S., 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 1598-1624.
- Antoniewicz A., Van Vuuren A. M., Van Der Koelen C. J., Kosmala J., 1992. Intestinal digestibility of rumen undergraded protein of formaldehyde-treated feedstuffs measured by mobile bag and *in vitro* technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 39, 111-124.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition. Washington, DC.
- Ball D. M., Collins M., Lacefield G. D., Martin N. P., Mertens D. A., Olson K. E., Putnam D. H., Undersander D. J., Wolf M. W., 2001. Understanding forage quality. American Farm Bureau Federation Publication 1-01, Park Ridge, IL.
- Besle J. M., Cornu A., Jouany J. P., 1994. Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion. *J. Sci. Food Agr.* 64, 171-190.
- Buxton D. R., Russell J. R., 1988. Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. *Crop Sci.* 28, 553-558.
- Cone W. J., Cliné-Theil W., Malestein A., Van 'T Klooster A. T., 1989. Degradation of starch by inoculum with rumen fluid. A comparison of different starch sources. *J. Sci. Agric.* 49, 173-183.
- Conrad H. R., Weis W. P., Odwongo W. O., Shockey W. L., 1984. Estimating net energy lactation from components of cell solubles and cell walls. *J. Dairy Sci.* 67, 427-436.
- Čerešňáková Z., Žitňan R., Sommer A., Kokardová M., Szakács J., Ševčík A., Chrenková M., 2000. Charakteristiky degradovatelnosti buněčných stěn a organické hmoty pasienkových porostů. *Czech J. Anim. Sci.* 45, 139-144.
- Deinum B., 1973. Structural inhibitors of quality in forage. *Växtöding.* 28, 42-51.
- Eastridge M. L., 2006. Major advances in applied dairy cattle nutrition. *J. Dairy Sci.* 89, 1311-1323.
- Ellis W. C., Poppi D. P., Matis J. H., Lippke H., Hill T. M., Rouquette., 1999. Dietary digestive-metabolic interactions determining the nutritive potential of ruminants diets. In: H. G. Jung, G. C. Fahey, jr. (Editors), *Nutrition and Ecology of Herbivores*, American Society of Animal Science. 423-481.
- Graham H., Aman P., 1991. Nutritional aspects of dietary fibres. *Anim. Feed Sci. Tech.* 32, 143-158.
- Harazim J., Pavelek L., Čerešňáková Z., Homolka P., Třináctý J., Jambor V., Pozdíšek J., Zeman L., 1999. Metodika pro stanovení degradovatelnosti dusíkatých látek a aminokyselin krmiv v bachoru přežvýkavců (Metoda „*in situ*, nylon bag“). Sborník mezinárodní vědecké konference „Stanovení využitelnosti živin u přežvýkavců“, Opava. 115-118.

- Homolka P., 1994. Predikce stravitelnosti objemných krmiv enzymem celulázou. Živ. Vyr. 39, 599-604.
- Huhtanen P., Hristov A. N., 2001. Estimating passage kinetics using fibre-bound ¹⁵N as an internal marker. Anim. Feed Sci. Technol. 94, 29-41.
- Hvelplund T., Weisbjerg M. R., 2000. *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability. In: D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford, H. M. Omed (Editors), Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CABI Publishing, 233-258.
- Jung G., Vogel K. P., 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. J. Anim. Sci. 62, 1703-1712.
- Koukolová V., Weisbjerg M. R., Hvelplund T., Lund P., Čermák B., 2004. Prediction of NDF degradation characteristics of grass/clover forages based on laboratory methods. J. Anim. Feed Sci. 13, 691-708.
- Kudrna a kol., 1998. Produkce krmiv a výživa skotu. Agrospoj Praha. 362 p.
- Lampeter W., 1970. Eine neue Methode zur serienmäßigen suchung der Verdaulichkeit *in vitro* mittels „künstlichen Pansens“. Int. Zt. d. Landw. 6, 664-668.
- Lund P., 2002. The effect of forage type on passage kinetics and digestibility of fibre in dairy cows. Ph.D.-Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University (Denmark). 171 p.
- McDonald I., 1981. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. J. Agr. Sci. 96, 251-252.
- McDougall E. I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 42, 99-109.
- Mertens D. R., 1993. Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants. In: H.G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, J. Ralph (Editors). Forage Cell Wall Structure and Digestibility. American Society of Agronomy. 535-570.
- Mertens D. R., 1994. Regulation of feed intake. In: G. C. Fahey, J. M. Collins, D. R. Mertens, L. E. Moser (Editors), Forage Quality, Evaluation and Utilization. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI. 450-493.
- Mertens D. R., 2000. Physically effective NDF and its use in dairy rations explored. Feedstuffs April. 10, 11-14.
- Meyer J. H. F., Mackie R. I., 1986. Microbiological evaluation of the intraruminal *in sacco* digestion technique. Appl. Environ. Microbiol. 51, 622-629.
- Míka V., 1985. Prognoz převarimosti organického věščestva po rastvorimosti prob svěžeskošennych rastěnj v celljulolitičeskych srědach. Seľskochoz. Biol. 8, 46-48.
- Míka V., Harazim J., Kalač P., Kohoutek A., Komárek P., Pavlů V., Pozdíšek J., 1997. Kvalita píce. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha. ISBN 80-96153-59-2, 227 p.

- NRC, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. National Research Council, Washington, USA. pp. 381.
- Ørskov E. R., McDonald I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agr. Sci.* 92, 499-503.
- Pozdíšek J., 1999. Možnosti stanovení stravitelnosti organické hmoty. Sborník mezinárodní vědecké konference „Stanovení využitelnosti živin u přežvýkavců“, Opava. 85-92.
- SAS Institute, 2000. SAS/STAT. User's guide, ver. 8, Vol. 1, 2 and 3. SAS Institute Inc., Cary, NC (USA). pp. 3884.
- Setälä J., Vaatainen H., Ettala T., 1984. *In vitro* evaluation of protein digestibility in the abomasum and small intestine of ruminants. *J. Agric. Sci. (Finland)*. 56, 151-161.
- Shaer H. M., Omed H. M., Chamberlain A. G., 1987. Use of fecal organisms from sheep for the *in vitro* determination of digestibility. *J. Agric. Sci., Cambridge*. 109, 257-259.
- Schiemann R., 1981. *Archiv. f. Tierernähr.* 31, 1-19.
- Søgaard, K., Weisbjerg M. R., Thøgersen R., Mikkelsen M., 2001. Laboratory methods for estimation of digestibility in forages for cattle, focussing on starch rich whole crop cereals (in Danish). Forskningsrapport no. 34. Statens Husdyrbrugsforsøg (Denmark). pp. 28.
- Sommer A. a kol., 1994. Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro přežvýkavce. Česká akademie zemědělských věd, Komise výživy hospodářských zvířat, ISBN 80-901598-1-8, 127 p.
- Sova Z., Bukvaj J., Koudela K., Kroupová V., Pješčák M., Podaný J., 1990. Fyziologie hospodářských zvířat. SPN Praha, 469 p.
- Stensig T., Weisbjerg M. R., Madsen J., Hvelplund T., 1994. Estimation of voluntary feed intake from *in sacco* degradation and rate of passage of DM and NDF. *Livest. Prod. Sci.* 39, 49-52.
- Sutton J. D., Cammel R., Phipps R. H., Beever D. E., Humphries D. J., 2000. The effect of crop maturity on the nutritional value of maize silage for lactating dairy cows 2. Ruminal and post-ruminal digestion. *Anim. Sci.* 71, 391-400.
- Tilley J. M. A., Terry R. A., 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forages. *J. Brit. Grassl. Soc.* 18, 104-111.
- Tománková O., Homolka P., 1995. Predikce střevní stravitelnosti dusíkatých látek nedegradovaných v bachoru enzymatickou metodou. *Živoč. Vyr.* 40, 171-175.
- Tománková O., Homolka P., 1997. Porovnání enzymatické metody a metody mobile bag pro stanovení střevní stravitelnosti nedegradovaného proteinu krmiv. *Živoč. Vyr.* 42, 219-222.
- Tománková O., Kopečný J., 1995. Prediction of feed protein degradation in the rumen with bromelain. *Anim. Feed Sci. Technol.* 53, 71-80.

- Traxler, M. J., Fox D. G., Van Soest P. J., Pell A. N., Lascano C. E., Lanna D. P. D., Moore J. E., Lana R. P., Vélez M., Flores A., 1998. Predicting forage indigestible NDF from lignin concentration. *J. Anim. Sci.* 76, 1469-1480.
- Třináctý J., Šustala M., Richter M., Doležal P., 2000. Hodnocení obsahu NDF v krmných dávkách skotu. *Krmivářství*. 5, 41-42.
- Urban F. a kolektiv, 1997. Chov dojeného skotu. Nakladatelství APROS, ISBN 80-901100-7-X. 288 p.
- Valentin S. F., Forbes J. M., Lescoat P., 1999. Comparison of voluntary intake by lactating cows of two maize silages with different *in situ* dry matter degradability. *Ann. Zootech.* 48, 211-218.
- Van Saun J. R., Koukal P., 2003. Výživa přežvýkavců – trávení sacharidů. *Farmář*. 1, 40-42.
- Van Soest P. J., 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J. Anim. Sci.* 26, 119-128.
- Van Soest P. J., 1994. *Nutritional Ecology of The Ruminant*. Cornell University Press. pp. 476.
- Vanzant E. S., Cochran R. C., Titgemeyer E. C., 1998. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.* 76, 2717-2729.
- Varga G. A., Whitsel T. J., 1991. Effect on nonstructural to structural carbohydrate kation on rate and extent of nutrient utilization *in situ*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 68, 275-286.
- Vencl B., 1985. Metodické zásady pro provádění bilančních a skupinových pokusů na přežvýkavcích. *VÚŽV Uhřetěves*. 36 p.
- Vencl B., 1988. Současný stav a perspektivy nových analytických metod pro stanovení stravitelnosti krmiv. Nové metody predikce stravitelnosti krmiv. Sborník referátů ze semináře, *VÚŽV Uhřetěves*. 1-12.
- Waldo D. R., 1986. Effect of forage quality on intake and forage-concentrate interactions. *J. Dairy Sci.* 69, 617-631.
- Weiss W. P., Conrad H. R., St. Pierre N. R., 1992. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 39, 95-110.
- Yang W. Z., Beauchemin K. A., 2006. Physically effective fiber: Method of determination and effects on chewing, ruminal acidosis, and digestion by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 2618-2366.
- Zebeli Q., Tafaj M., Steingass H., Metzler B., Drochner W., 2006. Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 89, 651-668.
- Zeman a kolektiv, 2006. Výživa a krmení hospodářských zvířat. 360 p, ISBN 80-86726-17-7.

VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Vědecké impaktované publikace:

Koukolová V., Weisbjerg M. R., Hvelplund T., LUND P., Čermák B., 2004. Prediction of NDF degradation characteristics of grass and grass/clover from laboratory methods. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 13. 691-708

Weisbjerg M. R., Koukolová V., Lund P., 2007. Rate of NDF degradation. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 16, Suppl. 2, 151-155.

Konferenční sdělení:

Koukolová V., Kobes M., Homolka P., Čermák B., 2004. Stanovení degradovatelnosti NDF pastevní píce *in vitro* metodami a jejich ověření metodou *in situ* na kanylovaných kravách. Sborník XXI. Dni živočišnej fyziologie, Košice. p. 51.

Koukolová V., Weisbjerg M., Homolka P., Čermák B., Kobes M., 2005. Neutral detergent fiber and its role in techniques to study rumen fermentation characteristics of forage. *Konference Dni výživy zvierat*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 100-103.

Koukolová, V., Weisbjerg M. R., Homolka P., 2006. Krmná hodnota trvalých travních porostů v závislosti na vegetační fázi píce v horské oblasti ČR. *Konference Výživa zvierat 2006*. Košice: UVL, 26-29.

Koukolová V., Homolka P., 2006. Produkční význam pastvy skotu vyjádřený nutričním potenciálem pastevní píce. Sborník referátů z VI. Ročníku mezinárodní vědecké konference, Agroregion 2006 – zvyšování konkurenceschopnosti v zemědělství, České Budějovice 24. 8. – 25. 8. 2006, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 105-108. ISBN 80-7040-869-3.

Koukolová V., Weisbjerg M. R., Homolka P., 2006. Krmná hodnota trvalých travních porostů v závislosti na vegetační fázi píce v horské oblasti ČR. X. mezinárodná konferenci študentov doktorandských študijných programov a mladých vedeckých pracovníkov v odbore Výživa a kŕmenie hospodárskych zvierat, Košice 14. 9. 2006. 26 – 29. ISBN 80-8077-035-2

Koukolová V., Homolka P., 2008. Význam hodnocení vlákniny ve výživě dojníc. *Výživa dojníc*, Pohořelice 5. 6. 2008. 25-30.

OBSAH

I. CÍL METODIKY A DEDIKACE	3
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	
1. Úvod	4
2. Literární přehled	
2.1. <i>Sacharidy a jejich význam ve výživě přežvýkavců</i>	4
2.2. <i>Nutriční potřeba dojníc</i>	6
2.3. <i>Vliv NDF na kvalitu mléka</i>	7
2.4. <i>Stravitelnost vlákniny</i>	8
2.5. <i>Metody predikce stravitelnosti krmiv</i>	9
3. Experimentální část metodiky	
3.1. <i>Materiál a metodika</i>	13
3.2. <i>Výsledky a diskuse</i>	14
3.3. <i>Závěr</i>	21
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU	22
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	23
V. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	24
VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	28

- Vydal:** Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves
- Název:** Hodnocení stravitelnosti neutrálně-detergentní vlákniny ve výživě skotu
- Autoři:** Ing. Veronika Koukolová, Ph.D.
Ing. Petr Homolka, Ph.D.
Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhřetěves; Oddělení výživy
a krmení hospodářských zvířat
- Oponenti:** Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
Děkan Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.
- Ing. Juraj Saksún
Vedoucí oddělení komodit skotu a krmiv, Odbor živočišných komodit
MZe ČR.

ISBN 978-80-7403-016-1

Vydáno bez jazykové úpravy.

Metodika vznikla jako součást řešení výzkumného záměru MZe ČR (MZE0002701403).