



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

METODIKA

Predikce bachorové degradovatelnosti dusíkatých látek krmiv enzymaticky s bromelainem

Autoři

Ing. Olga Tománková

Ing. Petr Homolka, Ph.D.

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

Oponenti

Doc. Ing. Bohuslav Čermák, CSc.

Jihočeská univerzita 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: 978-80-7403-012-3

OBSAH

I. CÍL METODIKY A DEDIKACE	4
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU	4
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	5
Teoretická část metodiky	6
<i>Význam bachoru v procesu trávení</i>	6
<i>Metody predikce degradovatelnosti N-látek</i>	6
Experimentální část metodiky	8
<i>Cíl práce</i>	8
<i>Materiál a metodika</i>	8
<i>Pokusná krmiva</i>	8
<i>Pokusná zvířata</i>	8
<i>In sacco stanovení</i>	8
<i>Enzymatická in vitro metoda</i>	9
<i>Výsledky</i>	11
<i>Závěr</i>	16
V. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	17
VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	19

Predikce bachorové degradovatelnosti dusíkatých látek krmiv enzymaticky s bromelainem

I. CÍL METODIKY A DEDIKACE

Vypracování a ověření *in vitro* metody pro stanovení bachorové degradovatelnosti dusíkatých látek krmiva s enzymem bromelainem. Na základě vlastních experimentů poskytnout ověřenou *in vitro* metodu zemědělským laboratořím za účelem rychlejšího a méně náročného stanovení s lepším zabezpečením standardních podmínek a reprodukovatelností výsledků. Metodika vznikla jako součást řešení výzkumného záměru MZE0002701403

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Teoretická část metodiky: Význam bachoru v procesu trávení
Metody predikce degradovatelnosti N-látek

Experimentální část metodiky: Cíl práce
Materiál a metodika
Výsledky
Závěr
Seznam literatury

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Metodika je nově zaměřena na enzymatické stanovení rozsahu bachorové degradace dusíkatých látek proteázou bromelainem a stanovení predikčních rovnic pro jednotlivé skupiny krmiv, pro vyjádření skutečných hodnot degradovatelnosti. *In vitro* enzymatická

metoda je citlivá na výběr proteolytického enzymu a výsledky mohou být limitovány nedostatečnou enzymatickou aktivitou v porovnání s bachorovým prostředím. Bromelain je proteáza se stabilní specifickou aktivitou na rozdíl od nejčastěji používané proteázy - Pronasa E skládající se z několika endoproteáz a peptidáz. Jejich poměrné aktivity se mění a jsou závislé na typu kultivace a způsobu izolace.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Na základě našich výsledků doporučujeme navržený postup jako standardní metodu pro stanovení bachorové degradovatelnosti dusíkatých látek krmiv u přežvýkavců. Jednoduché a rychlé stanovení v laboratorních podmínkách způsobem *in vitro* najde uplatnění v laboratořích zemědělské praxe.

TEORETICKÁ ČÁST METODIKY

Význam bachoru v procesu trávení

Výzkum výživy skotu přináší stále nové poznatky o metabolických pochodech, trávení a utilizaci živin. Klíčové místo v procesu trávení zaujímá bachor a to z hlediska objemu a trávicí kapacity zaživačeho ústrojí přežvýkavců. Je osídlen symbiotickou populací anaerobních mikroorganismů, které produkují širokou škálu enzymů štěpících bílkoviny a jiné živiny v krmivech, ovlivňují jejich efektivnost a využití a tím i produkční zdraví zvířete. Svou funkcí připomíná bachor pro mikroorganizmy fermentor, kde je prostředí ovlivňováno jak hostitelem tak mikroorganizmem. Trávení potravy v bachoru se uskutečňuje převážně cestou fermentace na které se podílí bachorová mikroflóra. Podstatnou složku rostlinné potravy tvoří proteiny. Skutečnost, že v bachoru dochází k hydrolyze proteinu a k mikrobiální syntéze nových bílkovin, byla zohledněna v současných systémech hodnocení krmiv. Základním rysem těchto systémů je snaha kvantifikovat změny přijatých dusíkatých látek v jednotlivých úsecích trávicího traktu. Na úrovni bachoru jde o stanovení degradability proteinu krmiva, umožňující vyčíslit přívod nedegradovaného proteinu a o stanovení tvorby mikrobiálního proteinu, který pro organismus představuje nejvýznamnější zdroj aminokyselin.

Krmiva se mezi sebou liší rozsahem a rychlostí degradace N-látek v bachoru. Variabilita mezi krmivy je způsobena kvalitou živin, související s jejich chemickou a fyzikální strukturou a primárním složením. Proto je nutné krmiva analyzovat stále detailněji a systémy hodnocení soustavně zdokonalovat v souladu s novými poznatky teorie výživy tak aby byl dosažen těsnější soulad mezi přívodem živin v krmivech a požadavky zvířat.

Metody predikce degradovatelnosti N-látek

Při hodnocení využitelnosti krmiv přežvýkavci má údaj o degradovatelnosti dusíkatých látek v bachoru značný význam. Pro jeho stanovení byla vypracována řada metod. Základní a referenční metodou stanovení jsou pokusy *in vivo* na zvířatech. Přiblížit se těmto hodnotám je možné dalšími *in sacco*, *in vitro* metodami a analýzou krmiv. Při výpočtu je nutné vzít v úvahu vliv bachorové fermentace (Sniffen et al., 1992; Russel et al., 1992).

Na kanylovaných přežvýkavcích se provádí stanovení degradovatelnosti *in sacco*. Tato metoda je nejpoužívanější praktická metoda stanovení v bachoru degradovaných dusíkatých

látek, která umožňuje stanovit efektivní degradovatelnost. Variabilita v kinetice trávení u jednotlivých druhů zvířat vyžadovala potřebu zdokonalit metodu zahrnutím hodnoty retenčního času (Orskov and Mc Donald, 1979). Metoda je založena na inkubaci vzorku krmiva v bachoru zvířete s bachorovou kanylou v nylonových sáčkích v příslušných časových intervalech. Stanovuje se jeho úbytek ze sáčků. Madsen a Hvelplund (1985) hodnotili vztah mezi metodami *in vivo*, *in sacco* a stanovením rozpustné frakce dusíkatých látek v krmivu. Uvedli nízký vztah mezi těmito metodami. Madsen a Hvelplund (1994) porovnávali také reprodukovatelnost metod ve 23 laboratořích u stejného souboru krmiv a navrhli standardizaci postupu *in sacco*.

Metody vycházející z práce se živými zvířaty jsou však technicky náročné, vyžadují standardizované podmínky krmení a nelze je realizovat v běžných laboratořích. I z důvodů časové náročnosti a pracnosti jsou proto vyvíjeny *in vitro* metody jako laboratorní postupy aplikovatelné v praxi. S rozvojem produkce proteáz byla zkoumána možnost využití těchto enzymů pro predikci degradace N-látek krmiv. Enzymatické metody využívající komerčně dostupné enzymy mají výhodu být úplně nezávislé na zvířeti, což má za následek menší variabilitu stanovení vlivem prostředí a tím i relativně jednoduchou standardizaci metody. Důležitým bodem při enzymatickém *in vitro* stanovení degradovatelnosti dusíkatých látek je výběr vhodné proteázy. Pro tento účel bylo testováno několik enzymů a jejich enzymatických aktivit (Kopečný et al., 1989, Krishnamoorthy et al., 1983). Mahadevan et al., (1987) pro tento účel izolovali proteolytické enzymy bachorových bakterií. Aufrère et al., (1991) použili proteázu ze *Streptomyces griseus*. Poos-Floyd et al., (1985) ověřovali proteolytické enzymy z řad jak bakteriálních proteáz tak i rostlinných proteáz u souboru jadrných krmiv a prokázali vysokou korelaci mezi metodou *in sacco* a metodami enzymatickými. Z rostlinných proteáz použili Mirza a Miller (2005) papain (*Carica papaya*) a ficin (*Ficus glabrata*) a také bachorovou proteázu (pronáza E) ze *Streptomyces griseus* pro stanovení degradace N-látek. Nově zaváděné a ověřované laboratorní metody pro hodnocení N-látek jsou vyhodnocovány podle souladu s výsledky *in sacco* (Coblentz et al., 1999; Cone et al., 2002; Cone et al., 2004; Chaudhry, 2007).

V naší práci posloužil soubor krmiv s hodnotami stanovenými metodou *in sacco* jako testovací soubor k ověření *in vitro* enzymatické metody.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST METODIKY

CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovení rozsahu degradace dusíkatých látek v bachoru enzymatickou metodou založenou na bromelainu. Určit vhodnost bromelainu k predikci degradovatelnosti proteinu v daných skupinách krmiv pomocí korelace s metodou *in sacco*. Stanovit predikční rovnice a doporučit je pro tuto metodu k testování krmiv pro přežvýkavce.

MATERIÁL A METODIKA.

Pokusná krmiva:

Soubor krmiv (n = 179) byl rozdělen podle chemických a fyzikálních vlastností do 5 skupin. Seznam a vlastnosti testovaných krmiv jsou uvedeny v tabulce 1.

Pokusná zvířata:

Pro náš experiment byly použity 2 krávy černostrakatého plemene, Denní krmná dávka sestávala z 14 kg kukuřičné siláže, 6 kg vojtěškového sena a 1 kg ječného šrotu s minerálním a vitamínovým doplňkem. Podávána byla dvakrát denně v 6⁰⁰ a 16⁰⁰ hodin.

***In sacco* stanovení:**

Stanovení *in sacco* (Qrskov, McDonald: 1979) bylo upraveno podle Homolka a kol. (1990). Vzorek suchého krmiva (1 g) mletý na velikost částic 1 mm byl navážen do polyesterového sáčku (6x12cm, otvory 53 μm) a v dvojím opakování inkubován v bachoru 4, 8, 16, 24 a 48 hodin. Ve zbytcích po inkubaci byl po předchozím promytí tekoucí vodou stanoven obsah dusíku podle Kjeldahlovy metody (AOAC, 2003). Časový průběh degradace byl vyjádřen křivkou:

$$y=(a+b)I-e^{-ct}$$

kde a = rozpustná frakce

b = nerozpustná, ale potenciálně degradovaná frakce

c = rychlost degradace frakce b

t = čas (h) inkubace

Výpočet efektivní degradovatelnosti byl proveden korekcí na hodnoty retenčního času. Ve výpočtech byla brána v úvahu výtoková rychlost částic z bachoru u objemné píče $0,046 \cdot h^{-1}$ a u jadrných krmiv $0,06 \cdot h^{-1}$ (Homolka et al.1990).

Enzymatická *in vitro* metoda:

Suchý vzorek (0,5g) mletý na velikost částic 1 mm byl inkubován v 50 ml 100 mM fosfátového pufru o pH 7,2 s 5 mM cysteinem, 1 mM EDTA, 1 mg.ml⁻¹ chloramfenikolu, a 3 mg bromelainu. Každý vzorek byl stanoven v trojím opakování. Do každé série se zařazuje kontrolní vzorek, pro případ variability fosfátového pufru a 2 slepé pokusy jako kontrolní měření samotného enzymu v pufru. Slepé pokusy dovolují poznat obsah proteinu v inkubačním roztoku.

Pro výpočet degradovatelnosti proteinu je nutné stanovit v původním vzorku krmiva hodnotu celkového dusíku a rozborovou sušinu. Z hodnot obsahu dusíku ve zbytcích krmiva po inkubaci v čase 24 hodin bylo vypočteno procento dusíku z navážky vzorku. Reciproká hodnota vyjadřuje degradované dusíkaté látky.

Příprava výsledného inkubačního roztoku:

Do zásobního roztoku 100 mM fosfátového pufru, pH 7,2 (140 ml 0,2 M NaH₂PO₄ + 360 ml 0,2 M Na₂HPO₄ doplněno do 1litru destilovanou vodou), s 1 mM EDTA, byl před každým stanovením přidán 5 mM cystein, 1 mg.ml⁻¹ chloramfenikolu, který omezuje vliv mikrobiální kontaminace a 3 mg bromelainu (Sigma, 2-4 U/mg protein) na 50 ml výsledného inkubačního fosfátového pufru. Jadrná krmiva s vysokým obsahem škrobu byla inkubována ve 40 ml výsledného inkubačního roztoku fosfátového pufru do kterého bylo přidáno 10 ml amylázového roztoku. Amyláza byla přidána v koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ α-amylázy (Bolamylasa, spec. aktivita 1,05 mg maltosy/h/mg, Lachema, Česká republika) a byla inkubována současně s bromelainem a krmivem. Inkubace probíhala v třepací lázni při teplotě 39 - 40 °C po dobu 24 hodin. Po ukončení inkubace krmiv byla reakce zastavena 25 % TCA (výsledná koncentrace 5 % TCA). Vzorky byly chlazeny a následně centrifugovány při otáčkách 5100 x g po dobu 5 minut. Zbytek krmiva byl kvantitativně převeden na filtrační papír (Filtr kval. KA 1, ø 125 mm, Fischer Scientific), dvakrát promyt 5% TCA a zmineralizován podle Kjeldahla (AOAC, 2003). Po mineralizaci byl obsah kvantitativně

převeden do 100 ml odměrné baňky a po promíchání a vytemperování na laboratorní teplotu doplněn destilovanou vodou do objemu 100 ml. Obsah amoniaku v mineralizátoru byl stanoven Nesslerovou metodou (AOAC, 2003).

Spektrofotometrické stanovení amoniaku Nesslerovým činidlem.

Princip stanovení: Dusík vázaný v bílkovinách se mineralizací s H_2SO_4 převede na amonnou sůl, která se stanoví spektrofotometricky s Nesslerovým činidlem. Nesslerovo činidlo tvoří s amoniakem žlutě zbarvený komplex $Hg_2J_2NH_2$. Intenzita zbarvení se měří spektrofotometrem.

Postup stanovení: Do zkumavek pipetujeme 100 μ l zmineralizovaného vzorku, doplníme na konečný objem 5 ml destilovanou vodou, přidáme 200 μ l Nesslerova činidla a po promíchání měříme extinkci na spektrofotometru při vlnové délce 410 nm proti slepému pokusu (5 ml destilované vody s 200 μ l Nesslerova činidla). Obsah amoniaku odečteme z kalibrační křivky.

Příprava kalibrační křivky:

Navážíme přesně 0,161 g vysušeného NH_4CL a doplníme do 100 ml destilovanou vodou. Vzniklý zásobní kalibrační roztok ještě 100x zředíme a z tohoto ředění připravíme sadu pracovních kalibračních roztoků:

- do zkumavek pipetujeme 0, 1, 2, 3, 4 a 5 ml zásobního (100x ředěného) kalibračního roztoku, co odpovídá 0; 4,2; 8,4; 12,6; 16,8; 21,0 μ g N
- doplníme do 5 ml destilovanou vodou.
- přidáme 200 μ l Nesslerova činidla do každé zkumavky
- změříme extinkci při vlnové délce 410 nm proti destilované vodě.

Stanovení kalibrační křivky z XY bodového grafu v Excelu umožňuje pomocí lineární regrese vypočítat parametry lineární rovnice $y = a + bx$ a korelační koeficient, který by měl být co nejbližší hodnotě 1. V opačném případě je nutné připravit nové kalibrační roztoky a postup zopakovat. Hodnota parametru b umožňuje stanovit přepočítávací faktor = $1/b$. Násobením extinkce přepočítávacím faktorem (po odčítání slepého pokusu a násobení faktorem ředění) vypočítáme obsah dusíku ve zbytcích krmiva po inkubaci v čase 24 hodin. Z hodnot obsahu dusíku pak bylo vypočteno procento dusíku z navážky vzorku. Reciproká hodnota vyjadřuje procento degradovaných dusíkatých látek.

Statistické metody:

Rozdíly mezi metodami *in sacco* a *in vitro* byly vyhodnoceny analýzou variance a jednoduchou lineární regresí (SAS Systém, CORR procedure, 2003).

VÝSLEDKY

Soubor krmiv (n = 179) byl rozdělen podle chemických a fyzikálních vlastností do několika skupin. Seznam a vlastnosti testovaných krmiv jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1. Skupiny krmiv a jejich průměrné hodnoty chemického složení v absolutní sušině.

Skupiny krmiv	n	S g/kg	OH g/kg	NL g/kg
1. Bílkovinné koncentráty a krmné směsi:				
podzemnice - extrahovaný šrot	4	930	925	439
řepka - extrahovaný šrot	3	915	928	394
sója - extrahovaný šrot	3	916	926	491
bavlna - extrahovaný šrot	2	911	921	474
slunečnice - extrahovaný šrot	1	939	931	387
sezam - extrahovaný šrot	1	939	912	459
lněné pokrutiny	1	915	943	404
koncentrovaná krmná směs	18	888	935	162
2. Jadrná krmiva:				
pšenice	4	866	952	140
triticale	1	862	940	144
ječmen	11	889	946	119
kukuřice	4	890	980	113
otruby pšeničné	4	886	959	157
oves	3	897	969	111
žito	1	881	980	111
3. Zelená píče:				
vojtěška	14	199	889	209
jetel	15	172	888	175
kukuřice	7	289	949	190
jílek	5	171	899	140
4. Seno				
travní porost	8	943	907	128
vojtěška	24	950	902	170
Siláž I: celé rostliny				
kukuřice	15	945	934	98
vojtěška	8	938	891	181
oves	1	962	867	82
luční porost	2	920	886	157
ječmen	5	957	942	90
pšenice + hrách	4	950	903	127
bob	1	949	878	173
5. Siláž II:				
skrojky řepy	9	959	731	127

n - počet vzorků, S-sušina, OH-organická hmota, NL-dusíkaté látky

Porovnání mezi degradovatelností dusíkatých látek metodou *in sacco* a enzymatickou *in vitro* metodou, hodnoty parametrů regresních rovnic, korelační koeficient a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2 Porovnání *in sacco* a enzymatické *in vitro* degradovatelnosti v daných skupinách krmiv

Krmivo	n	In sacco % NL	In vitro-enzym. % NL	a	b	r	RSD
Bílkovinné koncentráty a krmné směsi	33	71,93±7,07	78,05±7,86	21,34	0,648	0,720 ^{***}	7,072
Jadrná krmiva	28	72,81±11,08	75,19±11,43	43,42	0,388	0,423 [*]	10,145
Zelená píče	41	62,53±8,15	67,76±8,90	18,65	0,648	0,730 ^{***}	5,815
Seno + siláž I	68	63,48±14,35	73,38±13,17	-17,16	1,051	0,741 ^{***}	7,319
Siláž II	9	64,84±8,74	58,37±10,58	22,55	0,724	0,876 ^{**}	4,502

* P<0.05.

** P<0.005.

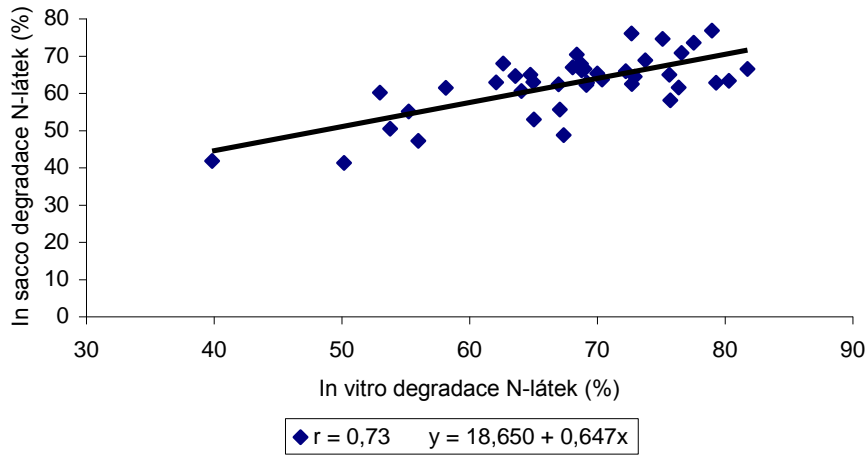
*** P<0.0001.

n - počet vzorků, NL – dusíkaté látky, a, b – parametry predikčních rovnic, r - korelační koeficient, RSD – reziduální směrodatná odchylka

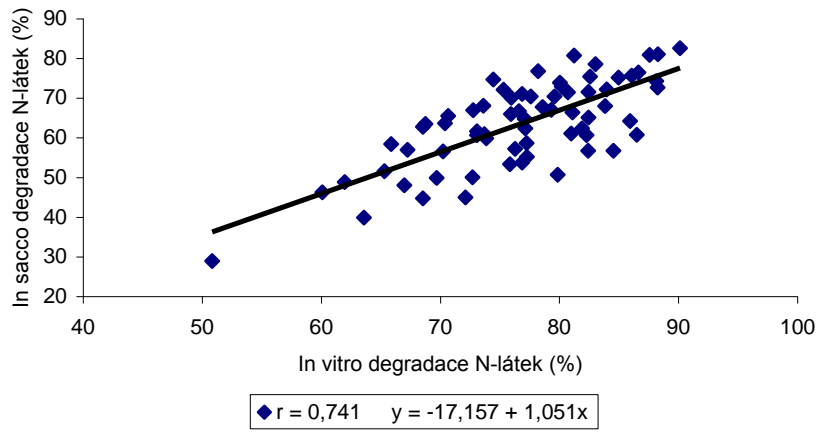
Závislost hodnot stanovených *in sacco* (y) na hodnotách stanovených *in vitro* – enzymaticky (x) byla vyjádřena pomocí lineární regrese pro 5 skupin krmiv (obr.1a – e): zelená píče; seno + siláž I; siláž II; bílkovinné koncentráty a krmné směsi; jadrná krmiva.

Obr. 1(a-e) Závislost hodnot degradace N-látek v bachoru stanovených metodami *in sacco* a *in vitro* s bromelainem.

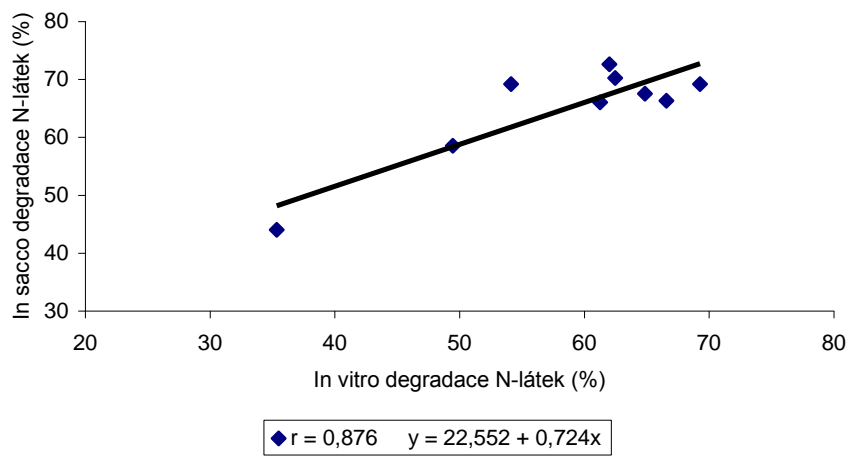
a: Zelená píce



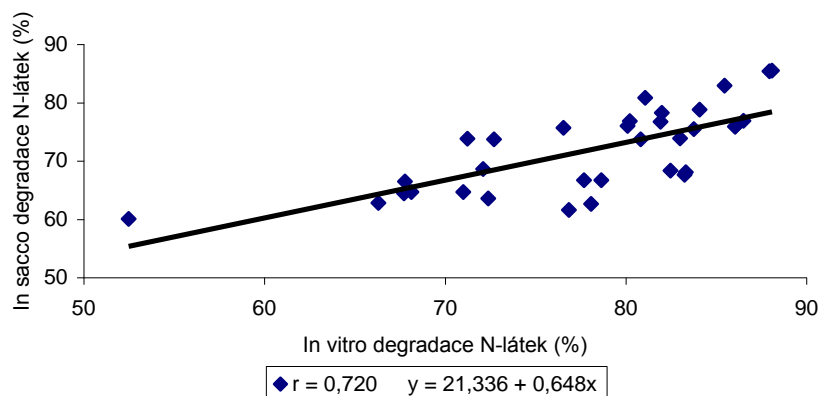
b: Seno + siláž I



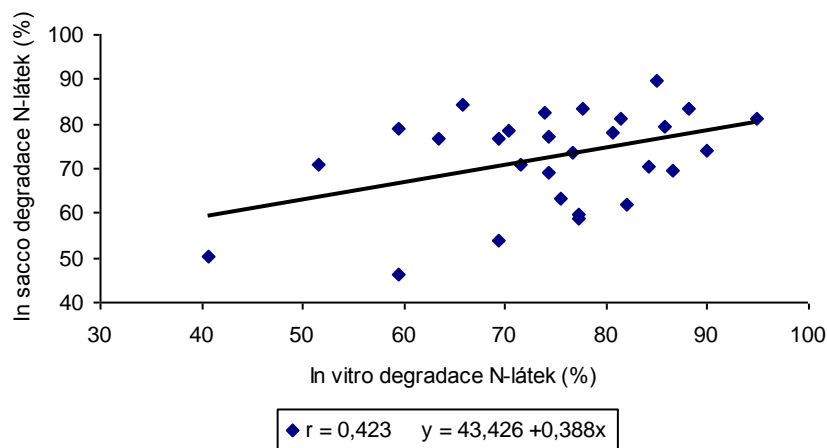
c: Siláž II



d: Bílkovinné koncentráty a krmné směsi



e: Jadrná krmiva



U všech těchto skupin byl získán korelační koeficient vyšší než 0,71 s výjimkou skupiny jadrných krmiv. Hodnoty korelačního koeficientu větší než 0,7 svědčí o silné korelační závislosti a výstižnosti, s níž zvolená regresní funkce tuto závislost popisuje. Toto potvrzuje, že naše metoda je pro tento účel využitelná. Výjimku tvoří skupina jadrných krmiv, u kterých byl korelační koeficient $r = 0,423$ (obr.1e). Enzymatická degradovatelnost dusíkatých látek u krmiv s vysokým obsahem škrobu nekorelovala s degradovatelností *in situ*, dokonce ani u jednoho druhu jadrného krmiva z důvodu omezené přístupnosti proteinu krmiva. Bylo nutné udělat další pokus s odbouráním škrobu v krmivech. Pro sestavení souboru bylo vybráno 19 krmiv s nejvyšším obsahem škrobu z předchozího souboru jadrných krmiv. Krmiva byla testována na ošetření α -amylázou. Pro soubor jadrných krmiv (Tab.3) bez použití amylázového ošetření byl korelační koeficient pouze o málo vyšší ($r = 0,555$).

Tab. 3. Vliv α -amylázy na stanovení bachorové *in sacco* a enzymatické *in vitro* degradovatelnosti jadrných krmiv

Amyláza	n	<i>In sacco</i> % NL	<i>In vitro</i> % NL	a	b	r	RSD
Bez amylázy	19	69,29±11,76	76,10±12,33	29,49	0,525	0,555*	10,666
S amylázou	19	69,29±11,76	84,83±6,64	-52,24	1,432	0,809***	7,104

*P<0.05.

***P<0.0001.

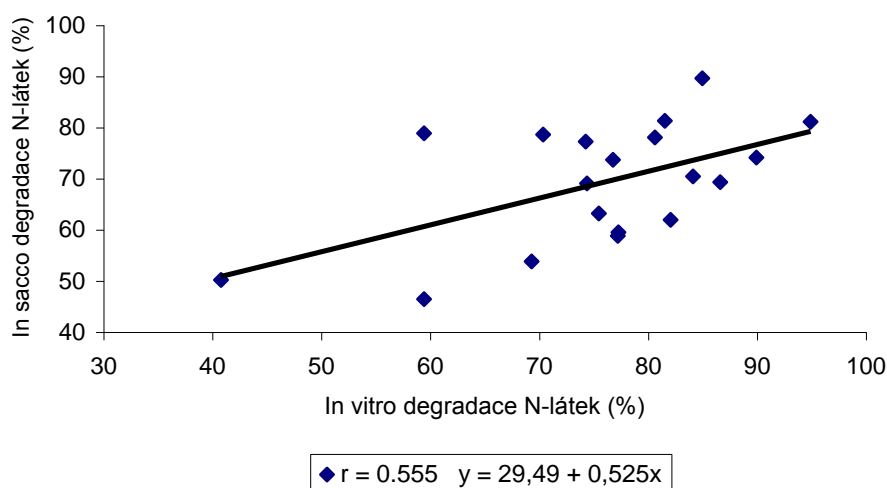
n - počet vzorků, NL – dusíkaté látky, a, b – parametry predikčních rovnic, r - korelační koeficient, RSD – reziduální směrodatná odchylka

Znovu bylo potvrzeno, že škrob limituje hranici přístupnosti proteinu krmiva. Proto bylo v stejné skupině jadrných krmiv použito ošetření amylázou, po zjištění optimální aktivity α -amylázy, nutné pro přesné stanovení degradovatelnosti. Bylo potvrzeno, že oba enzymy, α -amylázu a bromelain lze inkubovat současně po celou dobu 24 hodin.

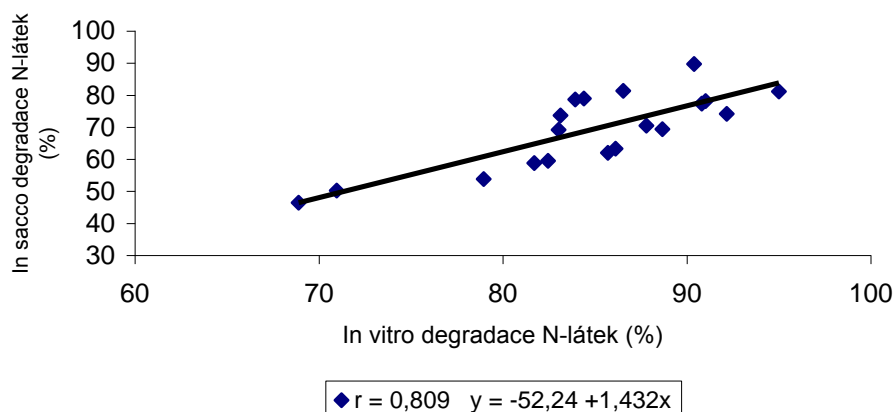
Po zařazení α -amylázy do pokusu se hodnota korelačního koeficientu lineární regrese pro jadrná krmiva významně zvýšila na $r = 0,809$, ($P < 0,0001$), (obr.2a-b). Tato hodnota byla srovnatelná s hodnotami korelačních koeficientů ostatních skupin krmiv.

Obr.2 (a-b) Závislost hodnot degradace N-látek v bachoru stanovených metodami *in sacco* a *in vitro* u jadrných krmiv

a: jadrná krmiva bez amylázy



b: jádřná křmiva s amylázou



Přesnost enzymatického stanovení opakovaných analýz u stejných křmiv byla $\pm 3,1$ %. Dále byl testován vliv přídavku kyseliny trichlóroctové (TCA) na hodnoty degradovatelnosti dusíkatých látek křmiv. TCA významně neovlivňuje hodnoty degradovatelnosti proteinu křmiv.

Ke zvýšení přesnosti stanovení je nezbytné vytvořit skupiny křmiv s podobnými vlastnostmi dusíkaté frakce. Z tohoto důvodu byla jádřná křmiva (Susmel et al., 1993) a seno (Auffrère et al., 1989) testována odděleně. Dále jsme odděleně testovali také siláže a proteinové koncentráty. Někteří autoři doporučují použít při testování jádřných křmiv a křmivých směsí směs α -amylázy a β -glukanázy a to v důsledku škrobové a celulózy stérické inhibice proteolytických enzymů. V našem případě bylo použito α -amylázy pro prevenci této inhibice dostatečné.

ZÁVĚR

- Důležitým bodem při enzymatickém stanovení degradovatelnosti dusíkatých látek je výběr vhodné proteázy. Bromelain je jednoduchý enzym. Jeho jednoduchost spočívá ve stabilní specifické aktivitě v porovnání s běžnými testovanými proteázami jako je například Pronasa E, která se skládá z několika endoproteáz a peptidáz. Její poměrné aktivity se mění a jsou závislé na typu kultivace a způsobu izolace.

- Metody *in vitro* neposkytují skutečné hodnoty zjištěné na zvířatech pomocí metody *in sacco*. Proto odvození regresních rovnic závislosti hodnot stanovených metodou *in sacco* na hodnotách získaných enzymaticky u souboru krmiv je důležitým předpokladem aplikace této metody.
- Přesnost stanovení je zajištěna vytvořením skupin krmiv s podobnými vlastnostmi dusíkaté frakce.

Na základě našich výsledků stanovení regresní závislosti enzymatické *in vitro* degradovatelnosti bromelainem a degradovatelnosti *in sacco* v daných skupinách krmiv a hodnot koeficientů korelace doporučujeme tuto metodu k testování krmiv pro přežvýkavce.

V. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington, DC: Association of official analytical chemists.

Aufrère J., Michalet-Doreau B., Graviou D., Vérite R., 1989. Predicting *in sacco* degradability of hay protein by chemical or enzymatic method. XVI Int. Grassland Congr. Nice, 887-888.

Aufrère J., Graviou D., Demarquilly C., Vérite R., Michalet-Doreau B., Chapoutot P., 1991. Predicting *in situ* degradability of feed proteins in the rumen by two enzymatic methods (solubility and enzymatic degradation). Anim. Feed Sci. Technol., 33, 97-116.

Coblentz W. K., Abdelgadir I. E. O., Cochran R. Z., Fritz J. O., Fick W. H., Olson K. C., Turner J. E., 1999. Degradability of forage proteins by *in situ* and *in vitro* enzymatic methods. J. Dairy Sci., 82, 829-839.

Cone J. W., Kamman A. A., van Gelder A., H., Hindle V. A., 2002. Rumen escape protein in concentrate ingredients determined with the nylon bag and enzymatic techniques. Anim. Feed Sci. Tech., 97, 247-254.

- Cone J. W., van Gelder A., H., Mathijssen-Kamman A. A., Hindle V. A., 2004. Rumen escape protein in grass and grass silage determined with the nylon bag and an enzymatic technique. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 111, 1-9.
- Chaudhry A. S., 2007. Enzymic and *in sacco* methods to estimate rumen degradation of food protein in cattle. *J Sci. food and agric.*, 87, 2617-2624
- Homolka P., Vencel B., 1990. Retention time of feed particles in forestomachs. New systems of energy and protein evaluation for ruminants. *Int. Symp, Prague*, 110-115.
- Kopečný J., Vencel B., Kyselová J., Březina P., 1989. Determination of rumen degradable protein with enzymes. *Arch. Anim. Nutr.*, 39, 549-555.
- Krishnamoorthy U., Sniffen C. J., Stern M.D., Van Soest P. J., 1983. Evaluation of a mathematical model of rumen digestion proteolysis to estimate the rumen undegraded nitrogen content of feedstuffs. *Brir. J. Nutr.*, 50, 555-568.
- Madsen J. and Hvelplund T., 1985. Protein degradation in the rumen. Comparison between *in vivo*, *nylon bag*, *in vitro* and buffer measurements. *Acta Agric. Scand. Suppl.*, 25, 103-124.
- Madsen J. and Hvelplund T., 1994. Prediction of *in situ* protein degradability in the rumen. Results of European ringtest. *Livest. Prod. Sci.* 39, 201-212.
- Mahadevan, S., Sauer, F. D., Erfle, J. D., 1987. Preparation of protease from mixed rumen mikroorganisms and ist use for *in vitro* determination of the degradability of true protein in feedstuffs. *Can. J. Anim. Sci.*, 67, 55-64.
- Mirza M. A. and Miller E. L., 2005. *In vitro* degradability of feed proteins in the rumen: use of non-rumen proteases. 58, 797-801.
- Qrskov E.R., McDonald I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to the rate of passage. *J. Agric. Sci.*, 92, 499-503.

Poos-Floyd M., Klopfenstein T., Britton R. A., 1985. Evaluation of laboratory techniques for predicting ruminal protein degradation. *J. Dairy Sci.*, 68, 829-839.

Russel J. B., O Connor J. D., Fox D.G., Van Soest P.J., Sniffen C.J., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.*, 70, 3551-3561.

[SAS] Statistical Analysis Systems Inc. 2003. SAS; Statistic's Version 9.1 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Sniffen C. J., O Connor J. D., Van Soest P. J., Fox D. G., Russel J. B., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.*, 70, 3562-3577.

Susmel P., Mills C. R., Colitti M., Stefanon B., 1993. *In vitro* solubility and degradability of nitrogen in concentrate ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 42, 1-13.

VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Tománková O., Komprda T., Homolka P.: Stanovení degradovatelnosti dusíkatých látek krmiv. In: Hodnocení dusíkatých látek krmiv pro přežvýkavce podle systému PDI. Studijní informace ÚZPI, řada Živočišná výroba, 1996, 16-21.

Tománková O., Homolka P.: Použití enzymatických metod při stanovení jednotek PDI. In: Hodnocení proteinové kvality krmiv pro přežvýkavce. Seminář Opava, 22. 10. 1996, 51-53.

Tománková O., Homolka P.: Prediction of intestinal digestibility of protein undegradable in rumen by a combined enzymatic method. *Czech J. Anim. Sci.*, 44, 1999, 323-328.

Tománková O., Homolka P.: Predikce střevní stravitelnosti proteinu nedegradovaného v bachoru kombinovanou enzymatickou metodou u objemných krmiv. IX. mezinárodní sympóziium „Konzervovanie objemových krmív“. Nitra, 1999, 166-167.

Tománková O., Homolka P., Škeříková A., Břenek Z.: Intestinal digestibility of rumen undegraded protein by a combined enzymatic method. The Annual Meeting of the E.A.A.P., Budapest, Hungary 2001, 105.

Homolka P., Tománková O., Břenek T.: Prediction of crude protein degradability and intestinal of rumen undegraded protein of protein supplements in cattle. Czech J. Anim. Sci., 47, 2002 (3): 119-123.

Homolka P., Tománková O.: Prediction of nutrition value of soybean meal and fodder yeast in cattle. In: Výživa dojnic a kvalita mléka (ekologické, zdravotní a hygienické faktory kvality a bezpečnosti mléka jako suroviny a potraviny). Sborník příspěvku z mezinárodního semináře. Pohořelice, 2007, 74-76.

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

Název: Predikce bachorové degradovatelnosti dusíkatých látek krmiv enzymaticky s bromelainem

Autoři: Ing. Olga Tománková
Ing. Petr Homolka, Ph.D.
Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhřetěves, Oddělení výživy a krmení hospodářských zvířat

Oponenti: Doc. Ing. Bohuslav Čermák, CSc.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 370 05 České Budějovice
Ing. Juraj Saksún
Ministerstvo zemědělství České republiky
Odbor živočišných komodit, 117 05 Praha 1

ISBN: 978-80-7403-012-3

Vydáno bez jazykové úpravy.

Metodika vznikla jako součást řešení výzkumného záměru Mze ČR (Mze0002701403).