



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Predikce střevní stravitelnosti dusíkatých látek uniklých degradaci v bachoru přežvýkavců kombinovanou metodou

Autoři

Ing. Olga Tománková
Ing. Petr Homolka, Ph.D.

Oddělení výživy a krmení hospodářských zvířat

Oponenti

prof. Ing. Bohuslav Čermák, CSc.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Ing. Jan Vodička
Ministerstvo zemědělství České republiky
Odbor živočišných komodit

Metodika vznikla jako součást řešení výzkumného záměru MZe ČR
(MZE0002701404).

ISBN 978-80-7403-063-5

Ministerstvo zemědělství České republiky
Těšnov 17
117 05 Praha 1

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. 17210/2010 – 16

o uznání uplatněné certifikované metodiky
v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

**Predikce střevní stravitelnosti dusíkatých látek uniklých
degradací v bachoru přežvýkavců kombinovanou metodou**

Ing. Olga Tománková, Ing. Petr Homolka, Ph.D.

*Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, Praha Uhřetěves*

ISBN 978-80-7403-063-5

Vypracované v rámci výzkumného záměru Mze
č. MZE 0002701404

V Praze dne 9. prosince 2010



Ing. Jiří Machek
ředitel odboru
živočišných komodit - 17210

OBSAH

I. Cíl metodiky a dedikace.....	4
II. Vlastní popis metodiky	4
Teoretická část metodiky	4
Experimentální část metodiky	6
Cíl práce.....	6
Materiál a metodika.....	6
Výsledky.....	10
Závěr	16
III. Srovnání novosti postupů	17
IV. Popis uplatnění metodiky	17
V. Seznam použité literatury	17
VI. Seznam publikací, které předcházely metodice	19

I. CÍL METODIKY A DEDIKACE

Cílem práce je ověřit kombinovanou metodu střevní stravitelnosti dusíkatých látek uniklých degradaci v bachoru přežvýkavců stanovenou v laboratoři bez použití kanylovaných zvířat. Určit vhodnost použití metody k predikci střevní stravitelnosti dusíkatých látek pomocí korelace s metodou *mobile bag* a stanovit predikční rovnice. Doporučit tuto metodu k hodnocení krmiv pro přežvýkavce a poskytnout ji zemědělským laboratořím za účelem rychlejšího a méně náročného stanovení, s jednodušším zabezpečením standardních podmínek a tím i lepší reprodukovatelností výsledků.

Metodika vznikla jako součást řešení výzkumného záměru MZE0002701404.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Teoretická část metodiky

Experimentální část metodiky:

- Cíl práce
- Materiál a metodika
- Výsledky
- Závěr

TEORETICKÁ ČÁST METODIKY

Úroveň dusíkaté výživy přežvýkavců byla dlouhá léta hodnocena podle systému SNL. Na základě aplikovaných vědeckých poznatků došlo v minulých letech k přehodnocení původního systému SNL, který ignoroval mikrobiální fermentaci a degradaci dusíku v bachoru a nerespektoval rozdíly ve využití zdrojů dusíku vstupujícího do tenkého střeva. Dusík dostupný organismu se odvozoval z rozdílu mezi množstvím dusíkatých látek (N-látek) přijatých v krmivu a vyloučených výkaly. Inovací zastaralého systému došlo k nárůstu sledovaných ukazatelů a to vyvolalo rozvoj a zavedení nových experimentálních metod. V současné době inovace systému umožňuje komplexněji zhodnotit množství a kvalitu N-látek v krmivech a optimalizovat zastoupení jednotlivých frakcí N-látek až na úroveň aminokyselin (Bateman et. al., 2001, Borucki Castro et. al., 2007). Moderní kritéria hodnocení krmiv poskytují možnost kvantifikovat změny přijatých N-látek individuálně, v jednotlivých úsecích trávicího traktu, v souladu

s fyziologickými pochody trávení. Zohledňují oddělené hodnocení degradovatelných N-látek v bachoru, střevní stravitelnost N-látek uniklých degradaci v bachoru a množství mikrobiálního dusíku (Vérité et. al., 1987). Nedegradované N-látky přecházejí z bachoru do tenkého střeva a spolu s mikrobiálním dusíkem představují využitelné N-látky krmiva. Proto hlavním kritériem potřeby N-látek pro přežvýkavce je množství využitelných, skutečně stravitelných N-látek v tenkém střevě.

Z uvedeného vyplývá, že pro hodnocení využitelnosti krmiv přežvýkavci mají údaje o degradovatelnosti N-látek v bachoru a střevní stravitelnosti N-látek uniklých degradaci v bachoru značný význam. Pro jejich stanovení existuje řada metod. Základní metodou stanovení jsou pokusy *in vivo* na zvířatech. Na kanylovaných zvířatech se provádí stanovení bachorové degradovatelnosti N-látek metodou *in sacco*. Ørskov a Mc Donald (1979) metodu zdokonalili zohledněním retenčního času z důvodu variability v kinetice trávení u jednotlivých druhů zvířat. Nejběžnější metodou pro vyhodnocení střevní stravitelnosti jak N-látek tak aminokyselin v duodenu kanylované krávy je metoda *mobile bag* (Berthiaume et al, 2000, Borucki Castro, 2007, Homolka et al., 2007, Homolka et al., 2008). Tyto metody vycházející z práce se živými zvířaty jsou technicky náročné, vyžadují standardizované podmínky krmení a z těchto důvodů je nelze realizovat v běžných laboratořích. Proto byl vývoj moderních systémů hodnocení krmiv podmíněn i intenzivním rozvojem jednodušších alternativních metod umožňujících rychlejší stanovení bez použití zvířat. Perspektivní je v případě *in vitro* metod využití komerčních proteolytických enzymů jak pro predikci degradovatelnosti N-látek v bachoru (Auffrère et al., 1991, Tománková a Kopečný, 1995, Mirza a Miller, 2005) tak i stravitelnosti N-látek krmiv nedegradovaných v bachoru (Antoniewicz et al., 1992, Van Straalen et al., 1993, Calsamiglia and Stern, 1995, Haugen et. al., 2006). Výhodou *in vitro* metod je časová a technická nenáročnost práce, menší variabilita stanovení vlivem prostředí a jednodušší reprodukovatelnost výsledků. Nedávají však skutečné hodnoty zjištěné na zvířatech, a proto jsou vyhodnocovány v souladu s výsledky *in sacco* (Tománková a Homolka, 2002, Woods et al., 2003, Cone et al., 2004, Chaudhry, 2007) z důvodů získání predikčních rovnic. Získané predikční rovnice jsou potřebné ke korekci stanovených hodnot a nepostrádatelné pro jejich aplikaci do praxe.

Této práci předcházely výzkum dvou metod (Tománková, Kopečný, 1995; Kopečný et al., 1998) dlouhodobě ověřovaných v našich laboratořích a podrobně popsanych v metodikách autorů Tománková a Homolka (2008) – *in vitro* metoda degradovatelnosti N-látek v bachoru a Tománková a Homolka (2009) – *in vitro* metoda stravitelnosti N-látek nedegradovaných v bachoru. Jejich propojení a následná modifikace postupu umožnila vznik kombinované metody.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST METODIKY

Cíl práce

Cílem práce bylo ověřit *in vitro* kombinovanou metodu využívající enzymy bromelain a pankreatin ke stanovení střevní stravitelnosti N-látek krmiv nedegradovaných v bachoru přežvýkavců. Kombinovaná metoda umožní stanovit hodnoty střevní stravitelnosti N- látek bez použití kanylovaného zvířete nahrazením 16hodinové preinkubace výchozího krmiva v bachoru kanylované krávy preinkubací *in vitro* v inkubačním roztoku pufru s proteolytickým enzymem bromelainem. *In vitro* preinkubace krmiva byla ověřována v časových intervalech 1hodina a 16 hodin. Na preinkubaci pak navazovala druhá fáze stanovení a to 24hodinová inkubace rezidua, které uniklo degradaci v bachoru. Inkubace probíhala v inkubačním roztoku s enzymem pankreatinem.

Důležitým předpokladem aplikace *in vitro* kombinované metody je korelace s metodou *mobile bag*, protože izolované proteázy mohou mít odlišné účinky na strukturu proteinu než proteázy bachorové mikroflóry. Porovnání metod *in vitro* a *mobile bag* umožnilo odvození predikčních rovnic pro dané skupiny krmiv. Stupeň závislosti hodnot určuje hodnota korelačního koeficientu, směrodatné odchylky a parametry regresních rovnic.

Materiál a metodika

Pokusná krmiva

Metodu jsme ověřovali na souboru krmiv ($n = 28$), který byl rozdělen na skupinu objemných krmiv ($n = 13$) a skupinu jadrných krmiv ($n = 15$). Objemná krmiva zahrnovala zelenou píci, siláže a silážované drtě. Skupina jadrných krmiv zahrnovala obiloviny, extrahované šroty a lněné pokrutiny. Spojení obilovin s extrahovanými šroty a pokrutinami bylo provedeno z hlediska podobného rozsahu degradace dusíkaté frakce. Přehled ověřovaných krmiv, spolu s obsahem N-látek v původním vzorku a v reziduu po 1hodinové a 16hodinové degradovatelnosti jsou uvedeny v tabulkách jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou (Tab. 1, Tab. 2).

Mobile bag metoda

Jako základní metodu pro porovnání ověřované metody a odvození regresních rovnic jsme použili metodu *mobile bag* (Frydrych, 1992) využívající kanylovaná zvířata. Experimenty se uskutečnili na čtyřech kravách černostrakatého plemene, z toho dvě, vybavené bachorovou kanylou, sloužily k přípravě nedegradovaných zbytků (reziduí). Rezidua po 16hodinové bachorové inkubaci

byly vkládány v malých polyesterových sáčcích do tenkého střeva dvou krav s duodenálními kanylemi.

Metoda *mobile bag* sestávala ze tří částí:

1. 16hodinová preinkubace krmiva v bachoru krávy za účelem získání reziduí. Po preinkubaci byly rezidua pečlivě proprány studenou vodou, zlyofilizovány, homogenizovány a naváženy do polyesterových sáčků
2. 2,5hodinová inkubace sáčků s rezidui v umělém bachoru s roztokem pepsinu a HCL při teplotě 39 °C a pH 2
3. stanovení střevní stravitelnosti N-látek krmiva v sáčcích po jejich vložení do duodena a po pasáži trávicím traktem

***In vitro* kombinovaná metoda:**

Kombinovaná metoda se skládá ze dvou základních kroků.

1. První krok (preinkubace krmiva) simuluje degradovatelnost krmiva v bachoru za účelem získání reziduí po určitém časovém intervalu degradace. Reziduum slouží jako výchozí vzorek pro stanovení střevní stravitelnosti N-látek krmiva, uniklých bachorové degradovatelnosti. Bachorová degradovatelnost krmiva probíhá v inkubačním roztoku fosfátového pufru s enzymem bromelainem.
2. Druhý krok simuluje trávení krmiva v prostředí tenkého střeva. Stanovujeme střevní stravitelnost N-látek uniklých bachorové degradovatelnosti. Inkubace rezidua probíhá v inkubačním roztoku fosfátového pufru s enzymem pankreatinem

ad 1). Bachorová degradovatelnost krmiva (preinkubace)

Postup práce:

Homogenizovaný a vysušený vzorek původního krmiva (0,5 g), mletý na velikost částic 1 mm, byl inkubován v 50 ml inkubačního roztoku fosfátového pufru s enzymem bromelainem po dobu 1 hodiny nebo 16 hodin. U jaderných krmiv s vysokým obsahem škrobu probíhala preinkubace v 50 ml výsledného inkubačního roztoku fosfátového pufru s bromelainem a amylázou (poměr 40:10). Amyláza byla přidána v koncentraci 0,5 mg α -amylázy (Bolamylasa, spec. aktivita 1,05 mg maltosy. h⁻¹. mg⁻¹, Lachema, Česká republika) na 1 ml inkubačního roztoku. Amyláza byla přidávána do inkubačního roztoku z důvodu odbourání škrobu, který limituje hranici dostupnosti proteinu pro bromelain. Inkubace krmiva probíhala současně s amylázou a bromelainem v třepací lázni při teplotě 39 ± 1 °C. Ověřovány byly inkubační časy 1 hodina a 16 hodin. Po ukončení inkubace byly rezidua chlazeny a následně centrifugovány při

otáčkách 5100 x g po dobu 5 minut. Reziduum bylo kvantitativně převedeno na filtrační papír (Filtr kval. KA 1, ø 125 mm, Fischer Scientific), důkladně promyto destilovanou vodou, filtrováno, vysušeno při teplotě 55 °C po dobu 24 hodin a použito pro druhý krok, stanovení střevní stravitelnosti N-látek nedegradovaných v bachoru založený na inkubaci s enzymem pankreatinem. Pro výpočet stravitelnosti N-látek nedegradovaných v bachoru je nutné stanovit v reziduu po 1hodinové a taky 16hodinové preinkubaci s bromelainem obsah dusíku a rozborovou sušinu. Do každé série byly zařazeny 2 slepé pokusy jako kontrolní vzorek měření samotného enzymu v pufru. Slepé pokusy dovolují poznat obsah proteinu v inkubačním roztoku.

Příprava výsledného inkubačního roztoku s enzymem bromelainem

Do zásobního roztoku 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,2 (140 ml 0,2 M NaH₂PO₄ + 360 ml 0,2 M Na₂HPO₄ doplněno do 1litru destilovanou vodou) bylo přidáno 1 mM EDTA. Těsně před každým stanovením byl přidán ještě 5 mM cystein, 1 mg.ml⁻¹ chloramfenikol (omezuje vliv mikrobiální kontaminace) a bromelain (Sigma, 2-4 U.mg⁻¹ protein) v koncentraci 6 mg na 100 ml výsledného inkubačního fosfátového pufru.

ad 2). Střevní stravitelnost N-látek uniklých degradaci v bachoru

Postup práce:

Homogenizovaný a vysušený vzorek rezidua (0,5 g) byl navážen do centrifugační kyvety a inkubován v třepací vodní lázni po dobu 2 hodin ve 20 ml 2 % roztoku pepsinu v 75 mM HCl (2g . l⁻¹, aktivita 3 mAnson units.mg⁻¹) při teplotě 39 ± 1 °C. Po ukončení inkubace byly kyvety s obsahem centrifugovány při otáčkách 5100 x g po dobu 5 minut. Po dokončení centrifugace byl pomocí vývěvy opatrně odstraněn supernatant. Následně bylo krmivo promyto 3krát destilovanou vodou, znovu centrifugováno, odstraněn supernatant a neutralizováno přibližně 20 ml předehřátým fosfátovým pufrem pH 7,4. Po neutralizaci byly kyvety s obsahem znovu centrifugovány, supernatant odstraněn a bylo přidáno 20 ml výsledného inkubačního pufru s pankreatinem. Po dvou hodinách bylo přidáno dalších 20 ml pufru pH 7,4 (39 °C) bez pankreatinu do každé centrifugační kyvety.

Příprava výsledného inkubačního roztoku s enzymem pankreatinem:

Do zásobního roztoku 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,4 (80 ml 0,2 M NaH₂PO₄ + 420 ml 0,2 M Na₂HPO₄ doplněno do 1litru destilovanou vodou) byl před každým stanovením přidán pankreatin (aktivita 4 x USP, koncentrace 600 mg.l⁻¹ fosfátového pufru). Takto připravený výsledný inkubační roztok byl použit ke 24hodinové inkubaci vzorku.

Celková inkubace probíhala v třepací vodní lázni při teplotě 39 ± 1 °C po dobu 24 hodin. Po ukončení inkubace byly vzorky chlazeny ve studené vodě

a následně centrifugovány při otáčkách 5100 x g po dobu 5 minut. Zbytek krmiva byl kvantitativně převeden na navlhčený filtrační papír (Filtr kval. KA 1, ø 125 mm, Fischer Scientific), pětkrát promyt destilovanou vodou a po důkladné filtraci zmineralizován podle Kjeldahla (AOAC, 2005). Po mineralizaci byl obsah mineralizační banky 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 spektrofotometricky Nesslerovou metodou. Každý vzorek byl stanoven v trojím opakování. Do každé série byly zařazeny 2 slepé pokusy jako kontrolní měření samotného enzymu v pufru. Z hodnot obsahu dusíku v reziduích krmiva po 24hodinové inkubaci bylo vypočteno procento dusíku z navážky rezidua po 1 nebo 16 hodinové degradaci. Reciproká hodnota vyjadřuje dusík stravitelný v tenkém střevě.

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 připravených zkumavek pipetujeme 100 μ l zmineralizovaného vzorku, ředíme destilovanou vodou na konečný objem 5 ml, přidáme 200 μ l Nesslerova činidla a měříme extinkci na spektrofotometru při vlnové délce 410 nm. Obsah amoniaku odečteme z kalibrační křivky.

Příprava kalibrační křivky: Do 100 ml odměrné banky navážíme přesně 0,161 g vysušeného NH_4Cl , po rozpuštění doplníme destilovanou vodou do objemu 100 ml. Vzniklý zásobní roztok ještě zředíme 100x a z tohoto ředění připravíme sadu pracovních kalibračních roztoků (pracovní roztok musí být vždy připraven těsně před stanovením):

- do zkumavek pipetujeme 0, 1, 2, 3, 4 a 5 ml zásobního (již 100x ředěného) kalibračního roztoku, což odpovídá 0; 4,2; 8,4; 12,6; 16,8; 21,0 μ g N
- doplníme do konečného objemu 5 ml destilovanou vodou.
- přidáme 200 μ l Nesslerova činidla do každé zkumavky
- změříme extinkci při vlnové délce 410 nm proti destilované vodě (měříme po 10 minutách od přidání Nesslerova činidla).

Stanovení kalibrační křivky z XY bodového grafu v Excelu (který porovnává dvojici hodnot) umožňuje pomocí lineární regrese vypočítat parametry lineární rovnice $y = a + bx$ a korelační koeficient. V grafu je možnost zobrazit rovnici regrese a zobrazit hodnotu spolehlivosti r , která by měla být co nejbližší hodnotě 1. V opačném případě je nutné připravit nové kalibrační roztoky a postup zopakovat. Hodnota parametru b umožňuje stanovit přepočítávací faktor. Přepočítávací faktor = $1/b$. Násobením extinkce přepočítávacím faktorem (po odčítání slepého pokusu a násobením faktorem ředění) vypočítáme obsah dusíku v reziduích krmiv po inkubaci v čase 24 hodin. Z hodnot obsahu dusíku pak

vypočítáme procento dusíku z navážky vzorku. Reciproká hodnota vyjadřuje dusík stravitelný v tenkém střevě.

Statistické metody:

Rozdíly mezi metodami *mobile bag* a *in vitro* byly vyhodnoceny analýzou variance a jednoduchou lineární regresí (Schéffeho metoda, PROC GLM) a korelační analýzou (PROC CORR) za použití statistického programu SAS Institute Inc. (2003).

Výsledky

Soubor obsahoval základní druhy krmiv. Vytvořením skupin krmiv s podobnými vlastnostmi dusíkaté frakce se zvyšuje přesnost stanovení. Pro výpočet hodnot střevní stravitelnosti je nutné znát obsah N-látek v reziduiích po preinkubaci. Přehled krmiv na kterých byla metoda ověřována a obsah N-látek v původním krmivu a v reziduiích po 1hodinové a 16hodinové preinkubaci krmiva v enzymatickém roztoku s bromelainem jsou uvedeny v procentech jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou v Tab. 1 a Tab. 2. N-látky vyjadřují množství dusíku stanoveného Kjeldahlovou metodou a násobeno přepočtovým faktorem 6,25.

Tab. 1. Přehled skupiny objemných krmiv a obsah N-látek v původním krmivu a v reziduiích po 1hodinové a 16hodinové preinkubaci

Objemná krmiva		n	N-látky (%)		
			celkové	reziduum/1h	reziduum/16h
zelená píče	jetel	2	19,97 ± 5,0	19,25 ± 7,6	13,57 ± 6,3
	vojtěška	3	19,92 ± 5,3	12,85 ± 3,7	8,02 ± 2,5
	luční porost	2	9,22 ± 1,8	5,53 ± 1,0	3,72 ± 0,7
siláž	skrojky řepy	1	11,19	9,31	7,88
	vojtěška	1	20,63	9,63	6,63
	jetel	1	18,63	13,81	8,75
silážované drtě	bob	1	15,88	11,63	9,00
	ječmen	1	11,13	3,31	2,75
	hrách+pšenice	1	12,31	5,13	4,00

Tab. 2. Přehled skupiny jadrných krmiv a obsah N-látek v původním krmivu a v reziduiích po 1hodinové a 16hodinové preinkubaci

Jadrná krmiva		n	N-látky (%)		
			celkové	reziduum/1h	reziduum/16h
obiloviny	pšenice	3	16,42 ± 3,2	6,5 ± 0,1	4,45 ± 0,6
	ječmen	2	14,09 ± 1,3	9,09 ± 1,3	5,58 ± 1,7
	oves	1	10,81	6,81	5,25
	žito	1	10,25	7,81	4,80
	kukuřice	2	11,03 ± 1,8	8,91 ± 0,7	7,28 ± 1,3
extrahované šroty	řepka	2	41,25 ± 5,4	34,38 ± 8,5	27,19 ± 10,2
	sója	2	58,44 ± 13,3	45,19 ± 9,2	25,04 ± 5,4
	sezam	1	50,81	32,75	20,19
pokrutiny	len	1	35,25	29,50	21,88

Kombinovaná metoda byla ověřována na vzorcích krmiv v časových intervalech preinkubace 1 a 16 hodin. Hodnoty střevní stravitelnosti stanoveny *in vitro* kombinovanou metodou a metodou *mobile bag* jsou uvedeny v tabulkách jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou (Tab. 3, Tab. 4). Vztah mezi hodnotami stanovenými kombinovanou metodou a metodou *mobile bag* byl vyjádřen rovnicemi lineární regrese. Stupeň závislosti stanovených hodnot určuje hodnota korelačního koeficientu (*r*), směrodatná odchylka (RSD) a parametry regresních rovnic (*a*, *b*), (Tab. 5).

Tab. 3. Porovnání hodnot střevní stravitelnosti N-látek nedegradovaných v bacheru stanovených kombinovanou metodou a metodou *mobile bag* u objemných krmiv

Objemná krmiva		n	Střevní stravitelnost N-látek (%)		
			KO/1h	KO/16h	MB
zelená píče	jetel	2	72,83 ± 2,3	69,56 ± 6,5	81,58 ± 6,0
	vojtěška	3	73,73 ± 3,5	66,78 ± 7,2	79,09 ± 4,1
	luční porost	2	65,35 ± 0,7	38,67 ± 6,6	69,57 ± 2,0
siláž	skrojky řepy	1	58,26	40,67	69,69
	vojtěška	1	70,83	44,61	70,58
	jetel	1	76,17	59,85	80,91
silážované drtě	bob	1	58,13	44,81	68,33
	ječmen	1	65,20	54,92	68,31
	hrách+pšenice	1	54,37	36,69	61,90

n = počet vzorků, KO/1h - kombinovaná metoda s 1hodinovou preinkubací krmiva, KO/16h - kombinovaná metoda s 16hodinovou preinkubací krmiva, MB - metoda *mobile bag*

Tab. 4. Porovnání hodnot střevní stravitelnosti N-látek nedegradovaných v bacheru stanovených kombinovanou metodou a metodou *mobile bag* u jadrných krmiv

Jadrná krmiva		n	Střevní stravitelnost N-látek (%)		
			KO/1h	KO/16h	MB
obiloviny	pšenice	3	82,20 ± 5,2	77,36 ± 7,6	92,71 ± 4,0
	ječmen	2	84,11 ± 0,7	77,40 ± 7,6	92,07 ± 4,8
	oves	1	67,82	64,59	72,02
	žito	1	73,65	75,66	86,49
	kukuřice	2	82,42 ± 0,2	77,49 ± 6,4	90,55 ± 5,7
extrahované šrotky	řepka	2	73,02 ± 1,9	68,70 ± 3,2	77,44 ± 4,1
	sója	2	92,90 ± 0,6	88,11 ± 2,7	97,87 ± 1,6
	sezam	1	84,03	72,50	97,07
pokrutiny	len	1	83,70	63,90	85,4

n = počet vzorků, KO/1h - kombinovaná metoda s 1hodinovou preinkubací krmiva, KO/16h - kombinovaná metoda s 16hodinovou preinkubací krmiva, MB - metoda *mobile bag*

Tab. 5. Lineární regrese mezi hodnotami zjištěnými *in vitro* kombinovanou metodou (1 a 16hodinová preinkubace krmiva) a metodou *mobile bag* v daných skupinách krmiv

Skupiny krmiv	n	a	b	r	RSD
celý soubor (1h)	28	7,446	0,993	0,923***	3,954
objemná krmiva (1h)	13	20,151	0,792	0,865***	4,029
jadrná krmiva (1 h)	15	9,916	0,972	0,848***	3,996
celý soubor (16 h)	28	43,745	0,584	0,839***	8,635
objemná krmiva (16 h)	13	51,315	0,418	0,827**	8,164
jadrná krmiva (16 h)	15	44,398	0,591	0,579*	6,902

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

*P < 0.05

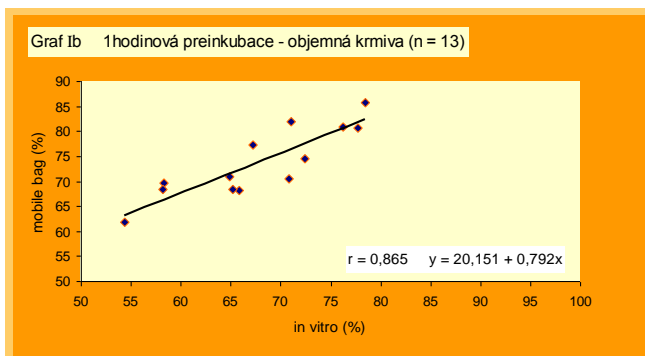
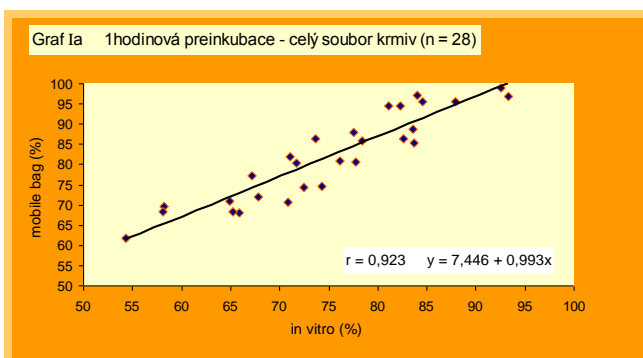
**P < 0.001

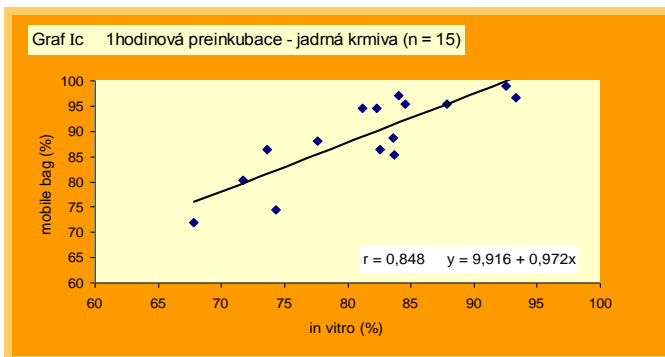
***P < 0.0001

Při hodnocení celého souboru krmiv ve dvou časových intervalech (1 a 16 hodin) a po porovnání hodnot jejich korelačních koeficientů a směrodatných odchylek byla vybrána metoda s 1hodinovou preinkubací, která vykazovala vyšší korelační koeficient ($r = 0,923$), než metoda s 16 hodinovou preinkubací ($r = 0,839$). Směrodatná odchylka byla nižší pro 1hodinovou preinkubaci (Tab. 5). Obě hodnoty korelačních koeficientů v souboru krmiv však poukazují na vysoký stupeň těsnosti vztahu a jsou statisticky významné na hladině $P < 0,0001$. Pro

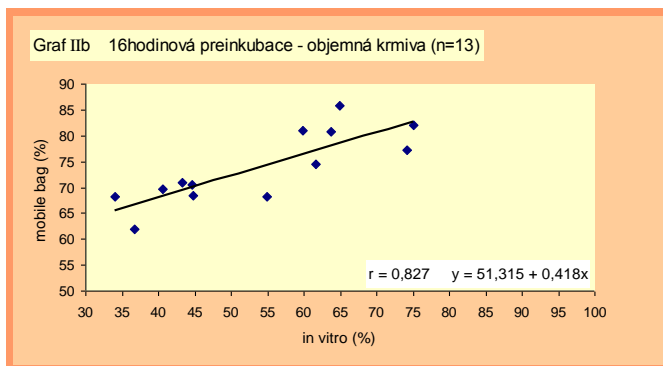
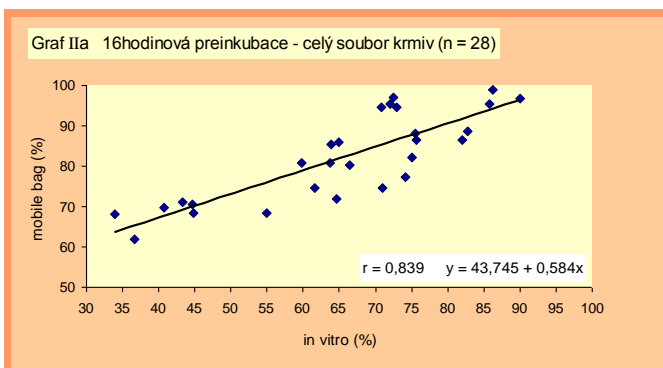
spřesnění výsledků jsme rozdělili soubor na dvě skupiny. Po porovnání hodnot korelačních koeficientů a směrodatných odchylek u těchto skupin byla rovněž vybrána metoda s 1hodinovou preinkubací s vyšším korelačním koeficientem u skupiny jak objemných krmiv ($r = 0,865$) tak i jaderných krmiv ($r = 0,848$ pro) oproti metodě s 16 hodinovou preinkubací ($r = 0,827$ pro objemná krmiva a $r = 0,579$ pro jaderná krmiva). Z Tab. 5 je zřetelné, že hlavně pro jaderná krmiva nevyhovuje metoda s 16hodinovou preinkubací ($P < 0,05$) i když bylo použito ošetření α -amylázou u krmiv s vyšším obsahem škrobu limitujícím hranici dostupnosti proteinu krmiva. Grafické znázornění lineární závislosti mezi oběma metodami (*mobile bag* a *in vitro*) je uvedeno v grafech Ia - Ic pro krmiva s 1hodinovou preinkubací a IIa - IIc pro krmiva se 16hodinovou preinkubací.

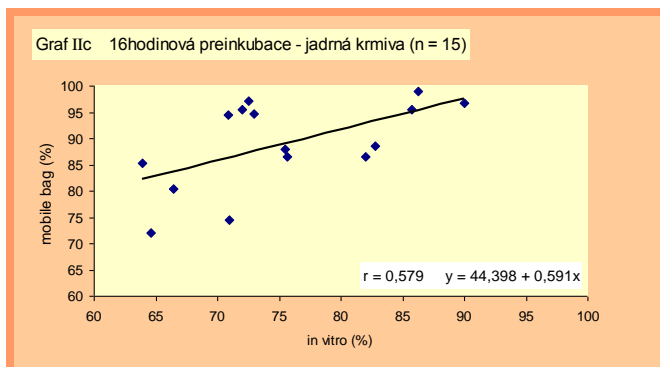
Grafy Ia - Ic **Závislost hodnot střední stravitelnosti N-látek nedegradovaných v bacheru získaných kombinovanou metodou a metodou *mobile bag* ve skupinách krmiv (1hodinová preinkubace)**





Grafy IIa - IIc Závislost hodnot střední stravitelnosti N-látek nedegradovaných v bachoru získaných kombinovanou metodou a metodou *mobile bag* ve skupinách krmiv (16hodinová preinkubace)





Korelační koeficienty pro celý soubor po 1 a 16hodinové preinkubaci (Graf Ia, IIa) a skupiny krmiv (Graf Ib, Ic) byly statisticky významné na hladině $P < 0,0001$. Pro časový interval 16hodinové preinkubace u obou skupin krmiv byly korelační koeficienty nižší, statisticky významné na hladině $P < 0,001$ u skupiny objemných krmiv (Graf IIb) a $P < 0,05$ u jadrných krmiv (Graf IIc).

Ověřována byla i preinkubace krmiva v časových intervalech – 0 hodin (bez preinkubace) a 24 hodin. Tyto inkubační intervaly se ukázaly již při prvních vyhodnoceních nevhodné ke stanovení stěvních stravitelností kombinovanou metodou. Při 24hodinové preinkubaci výrazně klesaly hodnoty stěvních stravitelností N-látek a při nulovém intervalu preinkubace hodnoty vykazovaly velkou variabilitu ve vztahu k hodnotám stanoveným metodou *mobile bag* a korelační pole bylo tak široké, že korelační koeficient byl téměř nulový.

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že metoda s 1hodinovou preinkubací krmiva je vhodnější než metoda se 16hodinovou preinkubací a její hodnoty se víc přibližují k hodnotám stanoveným metodou *mobile bag*. Kombinovaná metoda s 1hodinovou preinkubací krmiva může být použitelná v menších laboratořích bez potřeby kanylovaných zvířat. Neposkytuje však, tak jako všechny *in vitro* metody, skutečné hodnoty zjištěné na zvířatech. Naše ověřovaná metoda vykazuje nižší stanovené hodnoty stěvních stravitelností oproti metodě *mobile bag* (Tab. 3, 4). Proto odvození regresních rovnic a jejich použití k přepočtu hodnot stanovených *in vitro* kombinovanou metodou je důležitým předpokladem aplikace této metody. Výhodou kombinované metody pro běžnou praxi je její snazší uplatnění, protože nejsou potřebná zvířata s bacherovými a duodenálními kanyly.

Závěr

- Kombinovaná metoda umožňuje stanovit hodnoty střešní stravitelnosti dusíkatých látek bez použití kanylovaného zvířete nahrazením preinkubace výchozího krmiva v bachoru kanylované krávy preinkubací *in vitro*.
- Metoda s 1hodinovou preinkubací krmiva je vhodnější a její hodnoty se víc přibližují k hodnotám stanoveným metodou *mobile bag* než při 16 hodinové preinkubaci.
- Přesnost stanovení je zajištěna vytvořením skupin krmiv s podobnými vlastnostmi dusíkaté frakce.
- Metody *in vitro* neposkytují skutečné hodnoty zjištěné na zvířatech pomocí metody *mobile bag*. Proto důležitým předpokladem aplikace této metody je odvození predikčních rovnic závislosti hodnot stanovených *in vitro* kombinovanou metodou a metodou *mobile bag* v daných skupinách krmiv.
- Predikční rovnice pro kombinovanou metodu s 1hodinovou preinkubací:
pro objemná krmiva: $y = 20,151 + 0,792x$
pro jadrná krmiva: $y = 9,916 + 0,972x$

Výsledky experimentu potvrzují, že *in vitro* kombinovaná metoda střešní stravitelnosti N-látek s 1hodinovou preinkubací krmiva je vhodnou alternativou metody *mobile bag* a po korekci predikčními rovnicemi je použitelná k testování krmiv pro přežvýkavce.

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodika je nově zaměřena na ověření kombinované metody využívající proteolytické enzymy ke stanovení střevní stravitelnosti dusíkatých látek krmiv nedegradovaných v bacheru přežvýkavců. Původní *in vitro* metoda střevní stravitelnosti dusíkatých látek používá jako výchozí krmivo preinkubované 16 hodin v bacheru kanylované krávy s bacherovou kanylou. Kombinovaná metoda umožňuje nahradit bacherovou preinkubací krmiva preinkubací *in vitro* v inkubačním roztoku pufru s proteolytickým enzymem tak aby v laboratorních podmínkách co nejlíc simulovala preinkubaci v bacheru zvířete. Součástí ověření je porovnání hodnot kombinované metody s hodnotami stanovenými metodou *mobile bag* a odvození predikčních rovnic. Predikční rovnice jsou důležitým předpokladem aplikace této metody.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Na základě našich výsledků doporučujeme *in vitro* kombinovanou metodu k predikci střevní stravitelnosti dusíkatých látek nedegradovaných v bacheru přežvýkavců z hlediska jednoduššího a méně nákladního stanovení. Metody *in vitro* se stávají v praxi pro svou jednoduchost a rychlé stanovení v laboratorních podmínkách nezbytnými při posuzování nutriční hodnoty a kvality krmiv a nachází uplatnění v běžných laboratořích zemědělské praxe.

V. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [AOAC] 2005. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15th Edition, Washington, DC
- Antoniewicz A. M., Van Vuuren A. M., Van der Koelen C. J. and Kosmala J., 1992. Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of formaldehydetreated feedstuffs measured by *mobile bag* and *in vitro* technique. Anim. Feed Sci. Technol. 39:111-124.
- 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.
- Bateman H. G., II, Clark J. H., Patton R. A., Peel J. C., and Schwab C. G., 2001. Accuracy and precision of computer models to predict passage of crude protein and amino acids to the duodenum of lactating cows. J. Dairy Sci. 94:649-664.

- Berthiaume R., Lapierre H., Stevenson M., Coté N., and McBride B. W., 2000. Comparison of the *in situ* and *in vivo* intestinal disappearance of ruminally protected methionine. *J. Dairy Sci.* 83:2049-2056.
- Borucki Castro S. I., Phillip L. E., Lapierre H., Jardon P. W., and Berthiaume R., 2007. Ruminal degradability and intestinal digestibility of protein and amino acid in treated soybean meal product. *J. Dairy Sci.* 90:810-822.
- Calsamiglia S., Stern M. D., 1995. A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:1459-1465.
- 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. Technol.* 111:1-9.
- Frydrych Z., 1992. Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of various feeds as estimated by the *mobile bag* technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 37:161-172.
- Haugen H. L., Ivan S. K., MacDonald J. C., and Klopfenstein T. J., 2006. Determination of undegradable intake protein digestibility of forages using the mobile nylon bag technique. *J. Anim. Sci.* 84:886-893.
- Homolka P., Harazim J., Třináctý J., 2007. Nitrogen degradability and intestinal digestibility of rumen undegraded protein in rapeseed, rapeseed meal and extracted rapeseed meal. *Czech J. Anim. Sci.* 52 (11):378-386.
- Homolka P., Koukolová V., Němec Z., Muđřík Z., Hučko B., Sales J., 2008. Amino acid contents and intestinal digestibility of lucerne in ruminants as influenced by growth stage. *Czech J. Anim. Sci.* 53 (12):499-505.
- 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.
- Kopečný J., Tománková O., Homolka P., 1998. Comparison of protein digestibility of rumen undegraded protein estimated by an enzymatic and *mobile bag* method: feeds for ruminants and anaerobic fungus. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71:109-116.
- Mirza M. A. and Miller E. L., 2005. *In vitro* degradability of feed proteins in the rumen: use of non-rumen proteases. *Australian J. Agric. Research*, 56, (8): 797-801.
- Ørskov 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.
- SAS Institute (2003). SAS; Statistic's Version 9.1 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

- Tománková O., Homolka P., 2002. Intestinal digestibility of crude protein in concentrates determined by a combined enzymatic method. Czech J. Anim. Sci. 47 (1):15-20.
- Tománková O., Homolka P., 2008. Predikce bacherové degradovatelnosti dusíkatých látek krmiv enzymaticky s bromelainem. Metodika 2008, ISNB 978-80-7403-012-3, 20 s.
- Tománková O., Homolka P., 2009. Predikce střevní stravitelnosti dusíkatých látek uniklých degradaci v bacheru *in vitro* metodou. Metodika 2009, ISNB 978-80-7403-036-9, 22 s.
- Tománková O., Kopečný J., 1995. Prediction of feed protein degradation in the rumen with bromelain. Anim. Feed Sci. Technol. 53:71-80.
- Van Straalen W. M., Dopper F. M. H., Antoniewich A. M., Van Vuuren A. M., 1993. Intestinal digestibility in dairy cows of protein from grass and clover measured with *mobile nylon bag* and other method. J. Dairy Sci. 76:2970-2981.
- Vérité R., Michalet - Doreau B., Chapoutot P., Peyrand J.L., Poncet C., 1987. Revision du système des protéines digestibles dans l'Intestin (PDI). Bull. Tech. C. R. Z. V. Theix, INRA., 70:19-34.
- Woods V. B., Moloney A. P., Calsamiglia S. and O'Mara F. P., 2003. The nutritive value of concentrate feedstuffs for ruminant animals Part III. Small intestinal digestibility as measured by *in vitro* or *mobile bag* techniques. Anim. Feed Sci. Technol. 110:145-157.

VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Vědecké impaktované publikace:

- Tománková O., Kopečný J., 1995. Prediction of feed protein degradation in the rumen with bromelain. Anim. Feed Sci. Technol. 53:71-80.
- Kopečný J., Tománková O. Homolka P., 1998. Comparison of protein digestibility of rumen undegraded protein estimated by an enzymatic and *mobile bag* method: feeds for ruminants and anaerobic fungus. Anim. Feed Sci. Technol. 71:109-116.
- Tománková O., Homolka P., 1999. Prediction of intestinal digestibility of protein undegradable in rumen by a combined enzymatic method. Czech J. Anim. Sci. 44:323-328.

Tománková O., Homolka P., 2002. Intestinal digestibility of crude protein in concentrates determined by a combined enzymatic method. Czech J. Anim. Sci. 47, (1):15-20.

Metodiky:

Tománková O., Homolka P., 2008. Predikce bachorové degradovatelnosti dusíkatých látek krmiv enzymaticky s bromelainem. Metodika 2008, ISNB 978-80-7403-012-3, 20 s.

Tománková O., Homolka P., 2009. Predikce stěvních stravitelností dusíkatých látek uniklých degradaci v bachoru in vitro metodou. Metodika 2009, ISNB 978-80-7403-036-9, 22 s.

Ostatní publikace:

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

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

Homolka P., Tománková O., 2007. 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 příspěvků z mezinárodního semináře. Pohořelice, 74-76.

- Vydal:** Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves
- Název:** Predikce střevní stravitelnosti dusíkatých látek uniklých degradaci v bachoru přežvýkavců kombinovanou metodou
- 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:** prof. Ing. Bohuslav Čermák, CSc.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Ing. Jan Vodička
Ministerstvo zemědělství, odbor živočišných komodit

ISBN 978-80-7403-063-5

Vydáno bez jazykové úpravy.

Metodika vznikla jako součást řešení výzkumného záměru Mze ČR (MZE 0002701404).