

Standardowe metody oznaczania rozkładu białka pasz w przewodzie pokarmowym zwierząt przeżuujących*

Zygmunt M. Kowalski¹, Juliusz A. Strzetelski², Barbara Niwińska²,
Włodzimierz Nowak³, Janusz Pająk⁴, Agnieszka Szyszkowska⁵

¹Uniwersytet Rolniczy, Katedra Żywienia Zwierząt, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

²Instytut Zootechniki-PIB, Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa,
32-083 Balice k. Krakowa,

³Uniwersytet Przyrodniczy, Katedra Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej,
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań,

⁴Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna,

⁵Uniwersytet Przyrodniczy, Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa,
ul. Chełmońskiego 38 d, 51-630 Wrocław

Metoda oznaczania rozkładu białka ogólnego pasz w żwaczu – metoda woreczków nylonowych *in situ*

Zasady metody opracowano w ramach prac Zespołu ds. Żywienia Zwierząt Przeżuujących, działającego przy Instytucie Zootechniki-PIB w Krakowie-Balicach. Metoda dotyczy oznaczania współczynnika rozkładu białka pasz w żwaczu (r). Może być również wykorzystywana do oznaczania rozkładu w żwaczu suchej masy, skrobi, aminokwasów oraz NDF i ADF.

W związku z korzystaniem w obliczeniach zawartości BTJN i BTJE w paszach z równań opracowanych we francuskim instytucie INRA, zasadę metody standardowej przygotowano w oparciu o metodę woreczków nylonowych stosowaną w INRA (Michalet-Doreau i in., 1987) oraz o badania własne. W tabelach wartości pokarmowej pasz krajowych uwzględniane będą tylko te pasze, których rozkład białka w żwaczu oznaczono zgodnie z przedstawioną metodą standardową.

* Opracowano w ramach Zespołu ds. Żywienia Zwierząt Przeżuujących powołanego przez Instytut Zootechniki-PIB.

I. Zwierzęta

- Zabiegi operacyjne oraz warunki utrzymania zwierząt przetokowanych powinny być zgodne z zasadami ustalonymi przez Krajową Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach;
- Oznaczenia należy wykonywać na bydło (**wyodrębnione buhajki, wolce lub jałówki, krowy zasuszone**);
- **Trwale przetoki żwaczowe** powinny być założone w górnym worku żwacza;
- Zwierzęta powinny być utrzymywane na indywidualnych stanowiskach bezściolowych (np. na matach gumowych), najlepiej w boksach o wymiarach 3 m x 3 m.
- Zwierzęta powinny mieć stały dostęp do wody.

II. Dawka pokarmowa

- **Dawka pokarmowa** powinna pokrywać zapotrzebowanie bytowe ustalone według zasad systemu IZ-INRA (2001) – dopuszcza się zwiększanie go do 20%. W przypadku bydła rosnącego dawka powinna pozwalać na przyrost masy ciała nie przekraczający 500 g/dzień;

- Zwierzęta powinny być żywione indywidualnie **standardowymi dawkami pokarmowymi**, w których stosunek wagowy (suchej masy) paszy objętościowej do paszy treściwej będzie wynosił **70 : 30**;
- Zaleca się, aby paszą objętościową było siano łąkowe albo siano z traw o zawartości (w suchej masie) do 30% włókna surowego oraz powyżej 10% białka ogólnego;
- Wartość energetyczna 1 kg mieszanki treściwej powinna wynosić 0,9 – 1 JPM lub 0,9 – 1 JPŻ, natomiast zawartość białka ogólnego w dawce pokarmowej: **14 – 15%** suchej masy (110–120 g BTJ); zaleca się udział w mieszance treściwej przynajmniej 3 źródeł białka;
- W mieszance treściwej powinien znajdować się dodatek mineralno-witaminowy w ilości dostosowanej do zapotrzebowania zwierzęcia;
- Pasze powinny być zadawane dwa razy dziennie w równych porcjach (poranny i popołudniowy odpas, z 8-godzinną przerwą);
- Zwierzęta powinny otrzymywać standardową dawkę żywieniową przynajmniej przez 21 dni poprzedzających inkubację woreczków.

III. Przygotowanie próbki paszy

- Pasze przeznaczone do inkubacji powinny być **powietrznie suche**; pasze wilgotne należy suszyć w suszarce z obiegiem powietrza w temperaturze **do 55°C przez 48 godzin**, również kiszonki. W przypadku możliwości liofilizacji próbek pasz zaleca się ten sposób suszenia;
- Suchą próbkę należy zemleć młynkiem stosując sita o średnicy oczek **1,5 mm**, dotyczy to tak pasz objętościowych jak i treściwych;
- W próbce należy oznaczyć zawartość suchej masy (SM) oraz azotu. Obliczyć zawartość N w SM próbki przed inkubacją (**D**).

IV. Woreczki i przygotowanie woreczka z próbką

- Powinny być wykonane z materiału poliestrowego wolnego od azotu i nie ulegającego enzymatycznemu trawieniu w przewodzie pokarmowym;
- Wymiary oczek tkaniny: **50 (±10) µm**;
- Woreczki mogą być zgrzewane lub zszywane na 3 krawędziach;
- Należy opisać je używając pisaka odpornego

- na wymywanie i wysoką temperaturę;
- Woreczki wysuszyć w suszarce do stałej masy, w **temperaturze 80°C przez 1 godzinę**;
- Należy zważyć je na wadze analitycznej ($\pm 0,0001$ g) (A = sucha masa pustego woreczka);
- Stosunek masy próbki do powierzchni woreczka powinien wynosić około 20 mg/cm^2 – to powinno być podstawowym kryterium wielkości wymiarów wewnętrznych woreczka, jak i wielkości naważonej próbki. Firma ANKOM oferuje woreczki o wymiarach: 5 cm x 10 cm dla pasz treściwych (R510) oraz 10 cm x 20 cm dla pasz objętościowych (R1020);
- Woreczek wraz z próbką należy zamknąć w sposób uniemożliwiający wydostanie się paszy na zewnątrz w czasie inkubacji; należy zmierzyć wewnętrzną (czynną) powierzchnię woreczka. Zamknięcie woreczka (np. za pomocą gumki, żyłki wędkarskiej lub nierozpuszczalnych nici chirurgicznych) należy wykonać na wysokości około 1 cm od górnej krawędzi. Jeżeli wymiary wewnętrzne woreczka wynoszą 6 cm x 13 cm, to po zamknięciu jego powierzchnia wyniesie 2 cm x 6 cm x 11-12 cm, co pozwoli na umieszczenie w nim około **2,6 – 2,8 g naważki** ($\pm 0,0001$ g).

V. Inkubacja w żwaczu

- Każdą próbkę paszy należy inkubować w żwaczu przez **0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 godzin**; w przypadku pasz objętościowych zaleca się dodatkowy czas inkubacji, tj. 72 godziny;
- Woreczki należy umieszczać w worku brzuszным żwacza. Zaleca się inkubację woreczków w siatce wędkarskiej o wymiarach około 35 cm x 60 cm i wymiarach oczek 5 mm x 5 mm. Siatka do inkubacji powinna być zawieszona w żwaczu na linie o długości około 1 m. Woreczki w trakcie inkubacji powinny znajdować się w płynie żwacza, w worku brzuszным. Konieczne jest więc stosowanie obciążników siatki (ciężarki, metalowe kółka itp.);
- Zaleca się metodę jednoczesnego wkładania wszystkich woreczków bezpośrednio przed odpasem porannym i wyjmowania ich w odpowiednich terminach;
- Ze względów praktycznych 16-godzinna inkubacja może rozpoczynać się przed popo-

łudniowym odpasem, np. o godzinie 16:00 i kończyć przed odpasem porannym następnego dnia;

- Woreczek **godziny 0** moczyć w wodzie destylowanej o temperaturze $39 \pm 2^\circ\text{C}$ przez **15 minut**. Dla każdej paszy moczyć w wodzie destylowanej minimum po 3 woreczki.

VI. Powtórzenia i pasza standardowa

- W celu uzyskania niezbędnej ilości materiału do analiz chemicznych zaleca się inkubowanie odpowiedniej ilości woreczków, odpowiednio: dla czasu 0 – po 3 sztuki, dla czasów 2 do 24 – po 6 sztuk, dla czasu ≥ 48 – po 9–12 sztuk;
- Zaleca się prowadzenie oznaczeń na 3 zwierzętach, inkubując w żwaczu każdego z nich po 2 woreczki w każdym czasie inkubacji (3 zwierzęta x 2 powtórzenia); dopuszcza się również układ 2 zwierzęta x 3 powtórzenia;
- Dla każdej serii inkubacji w żwaczu **zaleca się** inkubację paszy standardowej, na przykład suszu z traw. Procedura przygotowania próbki suszu oraz woreczka z próbką – jak wyżej. Inkubacja w żwaczu paszy standardowej powinna trwać 8 godzin. Stosowanie próbki standardowej pozwala na ocenę prawidłowości przebiegu procesów fermentacyjnych w żwaczu. Gdy rozkład w żwaczu **suchej masy** paszy standardowej odbiega od wartości średniej dla tej paszy o ponad 5%, zaleca się powtórzenie oznaczeń;
- W trakcie inkubacji należy zwracać uwagę na stan zdrowia zwierząt i przebieg fermentacji w żwaczu; w przypadku jakichkolwiek zaburzeń badania należy przerwać do czasu ustabilizowania się procesów trawienia.

VII. Postępowanie z woreczkami po inkubacji

- Po zakończeniu inkubacji i wyciągnięciu ze żwacza woreczki należy wypłukać pod zimną, bieżącą wodą (usunięcie grubych części treści; wstępne płukanie);
- Po płukaniu wstępnym woreczki należy płukać w pralce automatycznej (3 razy cykl płukania, bez wirowania);
- Po płukaniu woreczki z pozostałością po inkubacji należy wysuszyć do stałej masy w suszarce z obiegiem powietrza w temperaturze około 60°C , **nie dłużej niż przez 48 godzin**;

- Wysuszone i ostudzone w eksykatorze woreczki należy zważyć na wadze analitycznej ($\pm 0,0001$ g) (**C = sucha masa woreczka wraz z pozostałością po inkubacji w żwaczu**);
- Jeżeli nie ma możliwości natychmiastowego wykonywania etapów płukania, **dopuszcza się** przechowywanie woreczków zamrożonych, w temperaturze poniżej -15°C ;
- Przed płukaniem należy woreczki rozmrażać w temperaturze pokojowej; procedura płukania – jak wyżej.

VIII. Obliczenia i analizy chemiczne

- Rozkład suchej masy w żwaczu (P_{SM}) dla każdego zwierzęcia i każdego czasu inkubacji oblicza się ze wzoru:

$$P_{SM} = 100 \times (B - (C - A)) / B$$

gdzie:

- A = sucha masa pustego woreczka (g)
- B = sucha masa próbki przed inkubacją w żwaczu (g)
- C = sucha masa woreczka wraz z pozostałością po inkubacji (g)

- Gdy wynik rozkładu SM uzyskany dla któregoś z woreczków różni się od pozostałych $>10\%$, pozostałości po inkubacji z tego woreczka nie uwzględnia się w próbce zbiorczej;
- Z pozostałości po inkubacji należy utworzyć próbki zbiorcze dla każdego zwierzęcia w obrębie każdego czasu inkubacji. W próbkach zbiorczych należy oznaczyć zawartość suchej masy oraz azotu. Obliczyć zawartość N w SM próbki po inkubacji (E);
- Rozkład białka ogólnego (azotu x 6,25) w żwaczu (P_N) dla każdego czasu inkubacji oblicza się ze wzoru:

$$P_N = 100 \times (D - E) / D$$

gdzie:

- D = ilość białka (azotu) w SM próbki przed inkubacją w żwaczu (g)
- E = ilość białka (azotu) w SM próbki po inkubacji w żwaczu (g)

- Stałe rozkładu białka w żwaczu (**a, b, c**) należy wyliczać z równania (Ørskov i McDonald, 1979):

$$P = a + b \times (1 - e^{-c \times t})$$

gdzie:

- P = rozkład białka w czasie t

a = rozpuszczalna frakcja białka
 b = frakcja nierozpuszczalna, ale potencjalnie ulegająca rozkładowi w żwaczu w tempie c
przy założeniu, że $a + b < 100$

- Efektywny rozkład białka w żwaczu (**ERŻ**) należy obliczyć z uwzględnieniem tempa wypływu treści ze żwacza 6%/godzinę ($k = 0,06$), korzystając z równania (Ørskov i McDonald, 1979):

$$ER\dot{Z} = a + (b \times c)/(c + k)$$

gdzie:

k = tempo wypływu części stałych ze żwacza (6%/godzinę, tj. $k = 0,06$)

- W obliczeniach **stałych rozkładu** oraz **ERŻ** zaleca się korzystanie z programu komputerowego NEWAY EXCEL (Chen, 1995), dostępnego jako freeware (<http://www.rri.sari.ac.uk/ifru/fcurve.html>) oraz z procedury NLIN metody MARQUARDT programu SAS;
- W obliczeniach BTJN i BTJE współczynnik rozkładu r odpowiada efektywnemu rozkładowi w żwaczu (**ERŻ**).

Metoda oznaczania strawności białka nie ulegającego rozkładowi w żwaczu (metoda woreczków przepływających przez jelita – mobilnych)

Oznaczanie współczynnika strawności jelitowej białka nie ulegającego rozkładowi w żwaczu (sjp) niezbędne jest do wyliczenia zawartości BTJP, BTJN i BTJE w paszach dla przeżuwaczy. W obliczeniach „sjp” konieczna jest znajomość wielkości rozkładu białka po 16-godzinnej inkubacji w żwaczu (Dg_{16}), oznaczonego metodą woreczków nylonowych *in sacco*. Metoda może być również wykorzystywana do oznaczania strawności jelitowej suchej masy, skrobi oraz aminokwasów.

Dla obliczenia wartości BTJP, BTJN i BTJE zastosowano metodę woreczków mobilnych według INRA (Peyraud i in., 1987) oraz wyniki z własnych doświadczeń i aktualnego piśmiennictwa.

I. Zwierzęta

- ❖ Zabiegi operacyjne, warunki utrzymania i żywienia zwierząt oraz kategorie bydła, na których wykonywane będą oznaczenia, są

podobne jak w metodzie dotyczącej rozkładu białka ogólnego w żwaczu;

- ❖ Oznaczenia zostaną przeprowadzone na zwierzętach z trwałymi przetokami do górnego worka żwacza i dwunastnicy w odległości około 10 cm za odźwiernikiem i przed ujściem przewodu trzustkowo-żółciowego.

II. Dawka pokarmowa

Podobna jak w metodzie oznaczania rozkładu białka w żwaczu.

III. Woreczki

- ❖ Powinny być wykonane z materiału poliestrowego wolnego od azotu i nie ulegającego enzymatycznemu trawieniu w przewodzie pokarmowym;
- ❖ Wymiary oczek tkaniny $50 (\pm 10) \mu\text{m}$;
- ❖ Zaleca się stosowanie woreczków zgrzewanych na 3 krawędziach;
- ❖ Zalecane wymiary wewnętrzne woreczka: 5 cm x 5 cm (ANKOM R55);
- ❖ Woreczki należy opisać używając pisaka odpornego na wymywanie i wysoką temperaturę;
- ❖ Należy wysuszyć je w suszarce do stałej masy w temperaturze 80°C przez 1 godzinę;
- ❖ Woreczki waży się na wadze analitycznej ($\pm 0,0001$ g) (A = sucha masa pustego woreczka).

IV. Przygotowanie próbki paszy

- ❖ Jak w metodzie oznaczania rozkładu białka ogólnego w żwaczu, suchą próbkę należy zmielić młynkiem stosując w nim sita o średnicy oczek 1,5 mm, dotyczy to zarówno pasz objętościowych, jak i treściwych;
- ❖ W próbce należy oznaczyć zawartość suchej masy oraz azotu ogólnego.

V. Przygotowanie woreczka z próbką

- ❖ Naważka paszy powinna wynosić około 1,2 g ($\pm 0,0001$ g);
- ❖ Woreczek wraz z próbką zamknąć przez zgrzanie 4 krawędzi, wtedy wymiary woreczka wyniosą 6 cm x 5 cm;
- ❖ Stosunek masy próbki do powierzchni woreczka ($6 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} \times 2 = 60 \text{ cm}^2$) powinien wynosić około 20 mg/cm^2 ;
- ❖ Dla każdej paszy należy przygotować minimum 15 woreczków (3 zwierzęta x 5 woreczków).

VI. Inkubacja woreczków w przewodzie pokarmowym

- ❖ Każdą próbkę paszy należy inkubować wstępnie w żwaczu przez 16 godzin, rozpoczynając poprzedniego dnia przed odpasem popołudniowym, zgodnie z *procedurą in sacco*;
- ❖ Inkubację woreczków w żwaczu powinno się przeprowadzić po uprzednim ich umieszczeniu w siatce wędkarskiej o wymiarach 35 cm x 60 cm i średnicy oczek 5 mm. W trakcie inkubacji woreczki powinny znajdować się w płynie żwacza w worku brzuszonym. Konieczne jest więc stosowanie obciążników siatki (ciężarki, metalowe kółka itp.). Siatka do inkubacji powinna być wyjmowana ze żwacza za pomocą linki o długości 1 m;
- ❖ Po wyciągnięciu ze żwacza woreczki należy wypłukać pod zimną bieżącą wodą (usunięcie grubych części treści). Gdy nie jest możliwa natychmiastowa inkubacja w roztworze pepsyny, woreczki po wypłukaniu należy umieścić w pojemniku z lodem;
- ❖ Po inkubacji w żwaczu woreczki wraz z pozostałością paszy inkubować przez 2,5 godziny w łaźni wodnej z łagodnym wstrząsaniem, w temperaturze $38,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, w roztworze pepsyny w kwasie solnym: 3 g pepsyny (300 – 600 U/mg) w 1 litrze 0,1 n HCl; pH roztworu = 2,0 (ustala się za pomocą 0,1 n NaOH). W 1 litrze roztworu inkubować nie więcej niż 30 woreczków;
- ❖ Po inkubacji w roztworze pepsyna-HCl woreczki należy wypłukać pod zimną bieżącą wodą i natychmiast włożyć do dwunastnicy przez przetokę dwunastniczą, w tempie nie przekraczającym 15 woreczków na godzinę/zwierzę (to jest w około 5-minutowych odstępach). W ciągu 1 doby nie należy wkładać więcej niż 30 woreczków na zwierzę;
- ❖ Woreczki odzyskuje się z kału, przy czym analizom poddaje się tylko woreczki odzyskane w przeciągu 24 godzin od włożenia do dwunastnicy.

VII. Postępowanie z woreczkami po inkubacji

- ❖ Po odzyskaniu woreczków w kale należy je dokładnie wypłukać pod zimną (około 10°C) bieżącą wodą (usunięcie grubych części kału, wstępne płukanie). Jeżeli nie ma możli-

wości natychmiastowego wykonywania dodatkowego płukania w pralce, dopuszcza się przechowywanie woreczków zamrożonych po wstępnym płukaniu, w temperaturze poniżej -15°C ;

- ❖ Woreczki należy rozmrażać w temperaturze pokojowej;
- ❖ Bezpośrednio po płukaniu wstępnym lub po rozmrożeniu woreczki należy wypłukać trzykrotnie w pralce automatycznej (bez wirowania), następnie wysuszyć do stałej masy w suszarce z obiegiem powietrza w temperaturze $60\text{--}65^{\circ}\text{C}$ przez 48 godzin;
- ❖ Wysuszone i ostudzone woreczki zważyć na wadze analitycznej ($\pm 0,0001$ g) (C = sucha masa woreczka wraz z pozostałością po odzyskaniu w kale).

VIII. Obliczenia i analizy chemiczne

- ❖ Połączyć pozostałości ze wszystkich woreczków po inkubacji w jelitach dla każdej paszy i przygotować próbkę zbiorczą dla każdego zwierzęcia (w przypadku posiadania 3 zwierząt powstaną 3 próbki zbiorcze);
- ❖ W próbkach zbiorczych należy oznaczyć zawartość azotu ogólnego, następnie obliczyć:
 - ilość N ogólnego w próbce odzyskanej w kale (D , g), według wzoru:

$$D = Np \times (C - A) / 100$$

gdzie:

Np = % zawartość azotu w suchej masie próbki po odzyskaniu w kale
 C = sucha masa woreczka wraz z pozostałością po odzyskaniu w kale (g)
 A = sucha masa woreczka (g)

- strawność białka ogólnego (azotu ogólnego x 6,25) w całym przewodzie pokarmowym (SCPP), według wzoru:

$$SCPP = 100 \times (B - D) / B$$

gdzie:

B = ilość białka ogólnego w próbce przed inkubacją (g)
 D = ilość białka ogólnego w próbce odzyskanej w kale (g)

- strawność jelitową białka ogólnego (azotu ogólnego x 6,25) nie ulegającego rozkładowi w żwaczu (sjp), uwzględniając SCPP oraz rozkład białka w żwaczu w czasie 16-godzinnej inkubacji (D_{g16}) i stosując równanie (wg Kowalski i in., 1995):

$$SJP = (Bx(100 - Dg_{16}) - Bx(100 - SCPP)) / (Bx(100 - Dg_{16}))$$

gdzie:

B = ilość białka ogólnego (azotu ogólnego x 6,25) w próbce przed inkubacją (g)

Dg_{16} = rozkład białka w żwaczu w czasie 16-godzinnej inkubacji (%)

$SCPP$ = strawność białka ogólnego w całym przewodzie pokarmowym (%)

- ❖ W podobny sposób można wyliczyć strawność jelitową aminokwasów, skrobi itp.

Literatura

Chen X.B. (1995). International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Buckburn, U.K.

Hvelplund T., Weisbjerg M.R., Andersen L.S. (1992). Estimation of the true digestibility of rumen undegraded dietary protein in the small intestine of ruminants by the mobile bag technique. Acta Agric. Scand., Sect. A, Anim. Sci., 42: 34–39.

IZ-INRA (2001). Normy żywienia bydła, owiec i kóz. Wartość pokarmowa pasz dla przeżuwaczy. Wyd. II, Instytut Zootechniki, Kraków.

Kowalski Z.M., Pisulewski P.M., Peyraud J.L., Kamiński J. (1995). The effect of drier outflow temperature on rumen protein degradability and intestinal

digestibility of rumen undegraded protein of dehydrated grass and lucerne. Ann. Zoot., 44, 88.

Michalet-Doreau B., Verite R., Chapoutot P. (1987). Methodologie de la degradabilite in sacco de l'azote des aliments dans le rumen. Bull. Tech. CRZV Thieux INRA, 69: 5–7.

Ørskov E. R., McDonald I. (1979). The estimation of protein degradability in rumen from incubation measurement weighted according to rate passage. J. Agric. Sci., 92: 499–503.

Peyraud J.-L., Genest-Ruquin C., Verite R. (1987). Mesure de la digestion de l'azote des de la quantite de materies azotees indigestibles en sachet des principaux. Reprod. Nutr. Develop., 28: 129–130.

STANDARD METHODS FOR DETERMINATION OF FEED PROTEIN DEGRADATION IN THE DIGESTIVE TRACT OF RUMINANTS

Summary

This paper presents a method for determination of dietary crude protein degradation in the rumen, known as the *in situ* nylon bag technique. The principles were developed by the Team for Ruminant Nutrition at the National Research Institute of Animal Production in Kraków-Balice. This method involves the determination



of the coefficient of feed protein degradation in the rumen (r). It can also be used to determine the ruminal degradation of dry matter, starch, amino acids, NDF and ADF.

Because the calculations were made using PDIN and PDIE values from equations developed at the French INRA Institute, the standard method was elaborated based on the nylon bag technique used by INRA and our own research. The tables for nutritive value of Polish feeds will only account for those feeds in which protein degradation in the rumen was determined in accordance with the standard method presented.

fot. B. Borys