



národní
úložiště
šedé
literatury

Stanovení ELOS (enzymaticky rozpustné organické hmoty) v píci s využitím tuzemských celuláz z *Trichoderma reesei*

Míka, Václav; Kohoutek, Alois; Pozdíšek, Jan; Němcová, Petra
2009

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-386520>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 04.09.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .



Václav Míka a kol.

Stanovení ELOS (enzymaticky rozpustné organické hmoty) v píce s využitím tuzemských celuláz z *Trichoderma reesei*

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

Praha 2009

Metodika vznikla za finanční podpory MZe a je výstupem řešení
výzkumného záměru VÚRV, v. v. i., reg. č.: MZE0002700604

„Udržitelné systémy pěstování zemědělských plodin pro
produkci kvalitních a bezpečných potravin, krmiv a surovin“

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 2009

ISBN 978-80-87011-54-6

Václav Míka, Alois Kohoutek, Jan Pozdíšek, Petra Němcová

Stanovení ELOS
(enzymaticky rozpustné organické hmoty)
v píci s využitím tuzemských celuláz
z *Trichoderma reesei*

UPLATĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Praha 2009

Anotace: Stravitelnost organické hmoty (OMD) se považuje za jeden ze základních ukazatelů kvality píce. K jejímu stanovení se v pícninářském výzkumu, šlechtění a v zemědělské praxi také v podmínkách ČR využívají především metody *in vitro*, využívající čisté celulolytické a proteolytické enzymy, s výhodou na přístroji ANKOM Daisy^{II} Incubator, a vyjádřené např. jako ELOS. Metodika je zaměřena na (1) optimální postup stanovení s ohledem na jeho přesnost (tj. co nejvyšší stupeň shody predikovaných hodnot s hodnotami metody kontrolní) a opakovatelnost (tj. shodu predikovaných hodnot při opakování stanovení) a (2) využití této exaktní a expeditivní metody pro účely sériového hodnocení s upozorněním na limity jejího nasazení.

Klíčová slova: stravitelnost organické hmoty; ELOS, kvalita objemných krmiv; metody *in vitro*; pícniny

Determination of ELOS (organic matter solubility in cellulases) in forage by domestic celluloses from *Trichoderma reesei*

Organic matter digestibility (OMD) is considered to be one of the main indicators of forage quality. In fodder research, breeding, and farming practice in the CR methods *in vitro* using clean cellulolytic and proteolytic enzymes in ANKOM Daisy Incubator are usually used for its determination and are expressed as ELOS. Methodology is focused on (1) the optimum procedure of determination with respect to its accuracy (i.e. the highest possible agreement of predicted values with the values of control method) and repeatability (i.e. agreement of predicted values of repeated determinations) and (2) the use of this exact and expedient method for serial evaluation with a warning about its limits.

Keywords: organic matter digestibility; ELOS; forage quality; methods *in vitro*; forage crops

Oponent:

1. RNDr. František Novotný, CSc., ÚKZÚZ Brno
2. Ing. Zdeněk Vorlíček, CSc.

Obsah

I Cíl metodiky	5
II Vlastní popis metodiky.....	6
Úvod.....	6
Stanovení ELOS na zařízení Ankom Daisyll.....	8
Účel a rozsah použití	8
Princip metody	9
Reagencie	9
Přístroje.....	9
Provedení	10
Výsledky a zhodnocení	11
III Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice, případně jejich zdůvodnění, pokud se bude jednat o novou neznámou metodiku	13
IV Popis uplatnění certifikované metodiky	14
V Seznam použité související literatury.....	14
VI Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány (pokud existují), případně výstupy z určité znalosti, jestliže se jedná o originální práci	15
VII Příloha: Metody stanovení celulósových preparátů	15
Příl. 1: FPA aktivita (EC 3.2.1.91 - filter paper activity)	15
Příl. 2: C _x aktivita (EC 3.2.1.4. - karboxymethylcelulósová aktivita)	17
Příl. 3: C ₁ aktivita (aktivita celulósových štěpících nerozpustný substrát) podle Záv. zpr. Výzk. úk. G-0-29-64, ČAZ-VÚPP Praha (1970).....	19
Příl. 4: 1,4 (1,3) β-glukanázová aktivita (EC 3.2.1.73)	20
Příl. 5: xylanázová aktivita (EC 3.2.1.32 – endo 1,3 – β-xylanáza)	22
Příl. 6: celobíázová aktivita (EC 3.2.1.21 – β-glukosidáza)	24

Metodika je určena pro zemědělskou praxi, poradce v oblasti zemědělství, pracovníky ve výzkumu, zemědělském školství a šlechtění. Pro její využití byla uzavřena smlouva se Svazem marginálních oblastí se sídlem Horní Police č. 1. SMO doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství, útvar: odbor výzkumu a vývoje, pod č.j. 41595/2009-18020.

Ministerstvo zemědělství ČR doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

Stanovení ELOS

(enzymaticky rozpustné organické hmoty)

v píci s využitím tuzemských celuláz

z *Trichoderma reesei*

Václav Míka, Alois Kohoutek, Jan Pozdíšek, Petra Němcová

I Cíl metodiky

Stravitelnost organické hmoty (OMD) se považuje za jeden ze základních ukazatelů kvality píce. K jejímu stanovení se v pícninářském výzkumu, šlechtění a v zemědělské praxi také v podmínkách ČR využívají především metody *in vitro*, využívající čisté celulolytické a proteolytické enzymy tuzemské provenience, s výhodou na přístroji ANKOM DaisyII Incubator a vyjádřené např. jako ELOS. Metodika je zaměřena na (1) praktickou aplikaci postupu stanovení s ohledem na jeho přesnost (tj. co nejvyšší stupeň shody predikovaných hodnot s hodnotami metody kontrolní) a opakovatelnost (tj. shodu predikovaných hodnot při opakování stanovení) a (2) s upozorněním na limity využití této exaktní a expeditivní metody při sériovém hodnocení v širokém měřítku pro potřeby výzkumu, šlechtění a zemědělské praxe. Přínosem je podstatné zvýšení efektivity a rychlosti prováděných exaktních rozborů ve smyslu naplnění praktických potřeb široké obce uživatelů, dále významná podpora ve sféře rozhodování, monitoringu procesů v oblasti primární zemědělské výroby. Vlastní popis metodiky

II Vlastní popis metodiky

Úvod

Stravitelnost organické hmoty (OMD) se považuje za jeden ze základních ukazatelů kvality píce, neboť vykazuje pravidelně těsný vztah k energetické hodnotě krmiva a zároveň poskytuje cennou informaci o dobrovolném příjmu píce zvířetem. Standardní stanovení stravitelnosti *in vivo* je však vázáno na krmný pokus se skupinou zvířat po definované období (MÍKA a kol., 1997, ZEMAN a kol. 2006), což je postup pro analýzu velkých počtů vzorků, resp. operativní použití v zemědělské praxi, málo použitelný s ohledem na potřebu velkého množství krmiva, náklady a časovou náročnost. Z mnoha laboratorních metod je třeba jmenovat především *in vitro* metody, založené na kultivaci testovaných krmiv s bachorovou tekutinou nebo čistými enzymy. V této oblasti je možno rozlišovat dva typy metod.

1. Stanovení stravitelnosti s gravimetrickým stanovením rozdílu hmotnosti vzorku po skončené fermentaci.
2. Stanovení stravitelnosti na základě těsného vztahu mezi stravitelností a množstvím plynů, které je uvolňováno při kultivaci s bachorovou tekutinou.

Do první skupiny lze zařadit i *in vitro*- inkubátor D220M DAISY^{II-220} */. Toto zařízení využívá principu fermentace ve filtračních sáčcích, známých z fermentací *in situ*, t.j. v bachoru (např. MÍKA a kol., 1982). Zatavené sáčky se vzorkem se vkládají (nejednou celkem až 100 ks) do uzavíratelných kontejnerů s roztokem proteolytického enzymu (fáze I), resp. celuláz definované aktivity (fáze II) po skončení předchozí fáze. Aktivní pohyb vzorků v médiu je zajištěn rotací nosiče kontejnerů. Metoda skýtá vysokou kapacitu rozborů při relativně malých nárocích na obsluhu, nákladech na provoz, s dobrou přesností a reprodukovatelností výsledků. (Místo čistých enzymů lze alternativně použít bachorové šťávy.) Podmínkou je, aby do jedné vsádky byly vkládány vzorky relativně stejnorodé, které se příliš neliší v obsahu látek modifikujících průběh fermentace (cf. např. KALAČ, MÍKA, 1997).

*/ výrobce: ANKOM Technology, 2052 O'Neil Rd, Macedon, NY, 14502 (USA) dovozce: O.K. SERVIS BioPro, s.r.o., Odlehlá 817/37, 190 00 Praha 9.

Proto se laboratoře na výzkumných ústavech a kontrolních bázích v Evropě a zvl. Severní Americe začínají vybavovat inkubátorem D220M DAISY^{II-220} s ohledem pro jeho multifunkční použití, velkou měřicí kapacitu, nízké jednotkové náklady rozborů, standardně dosahovanou přesnost, reprodukovatelnost výsledků a malé zatěžování prostředí při prováděné analýze. Inkubátor D220M DAISY^{II-220} je výrobcem deklarován v návaznosti na mezinárodní normy a tolerance.

V ČR již několik laboratoří zakoupilo přístroj D220M DAISY^{II-220}, avšak jeho praktické vytížení naráželo na příliš drahé celulytické enzymy s definovanou aktivitou (FOREJTOVÁ et al. 2005), používané především v biotechnologiích, např. pro tkáňové kultury. Ověřili jsme si, že stejně dobře lze využít tuzemské celulózy^{*/}. Jedná se o enzymový preparát, jehož složky pracují se synergickým účinkem:

- (1) endoglukanázy (tj. 1, 4 β – D – glukanglukanohydrolázy), které štěpí molekuly celulózy za vzniku různě dlouhých fragmentů celoglykosacharidů;
- (2) exoglukanáza, tedy celobiohydroláza (tj. 1, 4 β – glukancelobiohydroláza), která odštěpuje celobiózové jednotky z konce celulóзовých řetězců;
- (3) celobiázy (β – glukosidázy), štěpící celobiózu na glukózu.

Je to suchý sypký bílý až nažloutlý prášek, dobře rozpustný ve vodě při běžné teplotě. Jeho aktivita je u každé šarže deklarována (podle oficiálních rozborů) a charakterizována především ukazatelem RL.g⁻¹ (tj. redukujících látek)**/. Metodiky stanovení jednotlivých aktivit jsou uvedeny v příloze. Současná cena: 20 Kč.g⁻¹ (včetně DPH 19 %), pro srovnání celulóza z *Trichoderma viride* EC 3.2.1.4, Onozuka R-10 (Merck, kat. č. 102321), stojí 2 600 Kč.g⁻¹ (včetně DPH 19 %).

*/ od fy Bio – BN, veř. obch. spol. (Harantova 1198, 397 01 Písek)

**/ Aktivita enzymového preparátu (v mg substrátu/g/h):

proteáza	20 ± 5
β - 1,4 (1,3)- glukánáza	8005 ± 751
amyláza	2806 ± 313
xylanáza	6416 ± 546
celulóza	1616 ± 163

Stanovení ELOS na zařízení Ankom DaisyII

Účel a rozsah použití

Metoda slouží k laboratornímu sériovému stanovení enzymaticky rozpustné organické hmoty v roztocích pepsin-HCl a celuláz z *Trichoderma viride* různých vzorků pícnin (viz výše).

- U vzorků s obsahem škrobu nad 3% v sušině (např. kukuřičná siláž, GPS) je třeba standardní postup rozšířit o krok k jeho hydrolýze (DOWMAN, COLLINS, 1982). Přesnost stanovení OMD se tím u škrobnatých krmiv zvýší, ale popravdě řečeno, numerické shody s hodnotou OMD *in vivo* se dosáhne jen málokdy (ADESOGAN et al., 1998, MÍKA, nepublikované výsledky). Lepších výsledků se u škrobnatých vzorků dosáhne, jestliže na závěr I. fáze fermentace (tj. pepsin-HCl) se teplota obsahu fermentoru zvýší na 80 °C a ponechá 45 minut. Poté se zchladí na 40 °C.

Enzymový preparát byl připraven z kmene 139 houby *Trichoderma reesei*, jehož vzorek je uložen ve sbírce kultur hub katedry botaniky KU v Praze pod registr. č. 1853 CCF. *Trichoderma reesei* je anamorfa houby *Hypocrea jecorina*.

Stanovení bylo provedeno při ředění 2 mg.ml⁻¹. Vzorky se rozpouštěly ve 100 mmol fosfátovém pufru, pH 6,0. Po rozpuštění byly vzorky enzymů centrifugovány. Inkubace probíhaly 30 a 60 minut při 40 °C. Jako substráty byly použity: 0,4 % azokasein (Sigma), 0,5 % karboxymethylcelulóza (Fluka), 0,5 % rozpustný škrob (Fluka), 0,5 % ječný β-glukan (Sigma) a 0,5 % xylan z ječných otrub. Stanovení redukujících sacharidů bylo provedeno hydrazinem kyseliny p-hydroxybenzoové (LEVER, 1976).

- U vzorků obsahujících inulin není podle našich poznatků potřeba předřazovat krok k jeho odbourávání, neboť při pH 1,5 – 2, při teplotě 40 °C, po dobu 24 hodin (I. fáze fermentace) se tento v podstatě kompletně hydrolyzuje až na fruktózu, resp. ve vodě rozpustné oligosacharidy. Stupeň polymerace inulinu je ve srovnání se škrobem malý, tj. v rozpětí 5 – 65 molekul fruktózy + koncová glukóza.
- Pokud vzorky obsahují více než 6 % tuku, je třeba místo fermentace s pepsin-HCl zvolit postup s neutrálním detergentem (DOWMAN, COLLINS, 1982).

Princip metody

Usušený vzorek, semletý na mlýnku se sítím 1 mm, je vystaven účinku proteolytického enzymu (I. fáze fermentace) v trvání 24 hodin při 40 °C, a po té (II. fáze fermentace) roztokem celuláz v acetátovém pufru, 24 h, při 40 °C. Fermentace naváženého vzorku probíhá v sáčku z umělé hmoty F57, dodaného firmou Ankom. Nerozpustný zbytek po fázi I a II se vždy promyje vodou, vysuší, nechá okapat a na závěr fáze dvě vysuší do konstantní váhy při 105 °C, zváží a zpopelní při 550 °C. Z úbytku žíhání a obsahu sušiny a popela v původním vzorku se vypočítá obsah enzymaticky rozpustné organické hmoty (ELOS).

Reagencie

- * pepsin 2000 FIP- U/g (1:10 000, např. Merck Nr.107190)
- * kyselina chlorovodíková , c = ca 0,1 mol/l (8,3 ml/l)
- * kyselina octová 96%
- * octan sodný trihydrát, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- * celulázový preparát, např. od firmy BIO-BN Písek s deklarovanou celulytickou aktivitou 1616mg substrátu/g/h.
- * roztok pepsin – HCl : 2 g pepsinu se rozpustí v kyselině chlorovodíkové a doplní kyselinou chlorovodíkovou do litru.
- * roztok octanového pufru, pH 4,8, c = ca 0,1 mol/l
Roztok A: 5,9 ml kyseliny octové se zředí vodou a doplní vodou do 1l
Roztok B: 13,6 g octanu sodného se rozpustí ve vodě a doplní vodou do 1l.
Smíchá se 400ml roztoku A a 600 ml roztoku B, zkontroluje hodnota pH. Nastavení pH se děje eventuálním přidáním roztoku A nebo B.
- * roztok celuláz v pufru : 5,0g celuláz se rozpustí v roztoku pufru a roztokem pufru se doplní do 1l.

Přístroje

- * Ankom DaisyII, s originálními sáčky F57
- * Analytická váha
- * Pračka sáčků AEG při teplotě do 40 °C
- * Laboratorní sušárna
- * Muflová pec

Provedení

- * příprava sáčků
 - sáčky označit měkkou tužkou, tři opakování od každého vzorku a na celou várku čtyři sáčky jednoho standardu (tj. standardního vzorku se známou hodnotou OMD) a čtyři sáčky druhého standardu
 - sáčky propláchnout v acetonu, usušit je při 105 °C, zchladit v exikátoru
- * navažování vzorků
 - zvážení prázdných sáčků
 - navážení vzorků $0,300 \pm 0,0005$ g
- * zatavení sáčků na svářečce dodané s přístrojem, na tvar "biskupské čepice" (viz foto)



1. Sáček zatavený ve tvaru "biskupské čepice"

- * vložení sáčků do předem vytemperovaných fermentačních nádob (40 °C) po 24 kusech (12 a 12 kusů před a za přepážku, 1 standardní vzorek před přepážku a druhý standardní vzorek za přepážku) do každé baňky.
- * sáčky se zalijí vytemperovaným roztokem pepsin-HCl, 2 l do každé baňky. Fermentace (tzv. první fáze) trvá 24 h za nepřetržitého automatického otáčení baněk v přístroji Ankom.

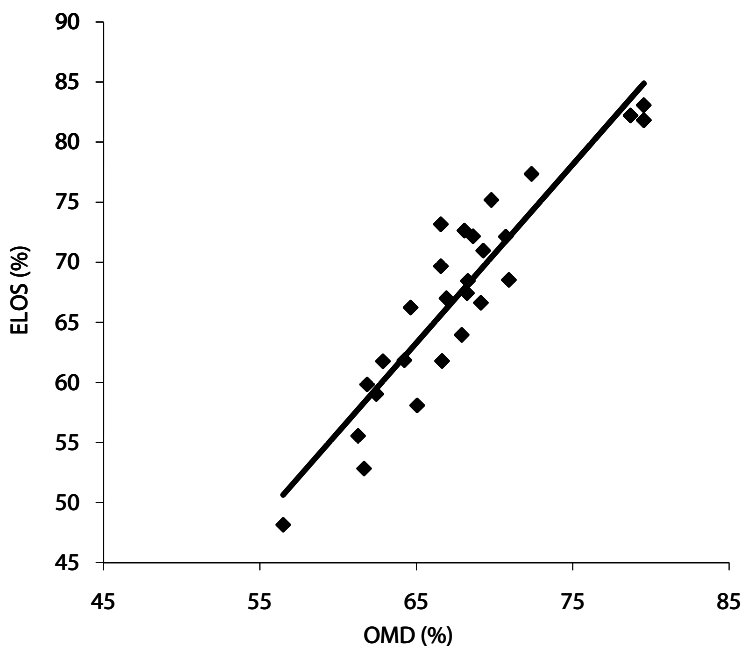
- * pokud se jedná o vzorky s obsahem škrobu nad 3% v sušině je třeba na závěr první fáze fermentace (pepsin-HCl) baňky přemístit do vodní lázně předehřáté na 80 °C na přesně 45 minut.
- * poté se fermentační roztok slije, baňky se naplní vodou ca 40 °C teplou, s obsahem se zamíchá a promývací voda slije. Promývání se provádí alespoň 3x (do vymizení kyselé reakce, kontrola indikátorem papírkem. Na závěr se na hrdlo baňky přiloží síto, baňka se sítem se obrátí, a vzorky nechají samovolně odkapat (ca 5–10 minut).
- * Po okapání se sáčky zalijí vytemperovaným roztokem celulózy, 2 l do každé nádoby. Probíhá druhá fáze fermentace za nepřetržitého otáčení v přístroji Ankom po dobu 24 hodin
- * Za 24 hodin po nasazení celulózy se z fermentační baňky roztok slije. Vzorky se umístí do pračky (např. AEG Elektrolux- LAVAMAT 72850) a vyperou (program – syntetika při 40 °C, 3x máchání, krátké odstředění při ca 800 ot/minutu, trvání ca 1 h 20').
- * Po vyprání se sáčky umístí do sušárny a suší při 105 °C po dobu 3 hodin.
- * Vysušené sáčky se vloží do exikátoru a zvaží na $\pm 0,0005$ g
- * Sáčky se zpopelní při 550 °C a zvaží.
- * Proveďte se výpočet.

$$ELOS = \frac{\text{navážka organické hmoty} - \text{nerozpustný zbytek organické hmoty}}{\text{navážka organické hmoty}} \times 100 (\%)$$

Výsledky a zhodnocení

K vyhodnocení shody a přesnosti stanovení ELOS s OMD byly použity vzorky jetelotrav z orné půdy, luční a pastevní píce, u nichž byla v krmných pokusech ve VÚCHS Rapotín a HBLFA Raumberg-Gumpenstein (Rakousko) stanovena hodnota OMD *in vivo*. Soubor představovalo 27 vzorků, s hodnotou OMD *in vivo* (v obr. 2 = osa x) 67,7 a stanovenou hodnotou ELOS podle výše popsaného postupu (= osa y) 67,3. Regresní rovnice má tvar $y = -33,630 + 1,491x$. R.S.D. činí 1,392; korelační koeficient $r = 0,924 \pm 0,016$

Přesnost stanovení je přijatelná a soudě podle korelačního koeficientu r , stanovená hodnota ELOS dává užitečnou informaci o OMD. Pozoruhod-



2. Srovnání ELOS s OMD (%)

ná je shoda stanovených hodnot jednotlivých opakování ($n = 3$). Při toleranci chyby ve výši 1,5 % (rel.) činí ELOS minimální počet opakování 1,7, zatímco u dnes už „klasické“ metody *in vitro* s bachorovou šťávou podle TILLEY, TERRY (1963) 2,5 (POZDÍŠEK, nepublikované výsledky). Shodný poznatek uvádějí JONES, THEOROROU (2000) v synopsi světové literatury k tomuto problému. Je to nesporná výhoda využívaná mj. v odrůdovém zkušebnictví, kde lze takto velice přesně detekovat i relativně malé rozdíly.

Na základě našich tříletých srovnávacích pokusů se prokázalo, že metoda ELOS je vhodná k objektivnímu hodnocení kvality píce usušených a pomletých vzorků (<1 mm) trav, jetelovin, jejich směsí, travních porostů, sena, siláží, kukuřice a jiných polních pícnin, a doporučujeme ji k širokému využití v praxi.

III Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice, případně jejich zdůvodnění, pokud se bude jednat o novou neznámou metodiku

1. Popsaná metodika používá velice levné tuzemské celulózy s vyváženou celulolytickou a další aktivitou k hydrolýze lignocelulózových materiálů (viz str. 7). Současná cena: 20 Kč/g (včetně DPH 19 %), pro srovnání celulóza z *Trichoderma viride* EC 3.2.1.4, Onozuka R-10 (Merck, kat. č. 102321), stojí 2.600 Kč/g (včetně DPH 19 %). Všechny součásti použitého celulózového preparátu jsou potřebné pro efektivní rozpouštění stravitelného podílu píce, neboť jsme v další (zatím nepublikované) práci stanovili komplikované synergické efekty existující mezi jednotlivými enzymy. Je podstatné, že celulózový preparát vykazuje všechny významné komponenty celulózového komplexu potřebné pro rozbory krmiv.

Poznámka ke zdroji enzymů: *Trichoderma reesei* je mesofilní vláknitá houba. Podle současné nomenklatury to je anamorfa houby *Hypocrea jecorina*. Má schopnost vytvářet velké množství celulolytických enzymů (zvl. celulóza a hemicelulóza), což nachází mj. řadu významných aplikací v průmyslové konverzi celulózy (hlavní součásti rostlinné biomasy) až na glukózu.

Většina kmenů *Trichoderma* nemá sexuální formy a místo nich vytváří asexuální spóry. Jen málo zástupců *Ascomycetes* (kam *Trichoderma reesei* patří) tyto sexuální formy vytváří a podle posledních zjištění mezi nimi i rod *Hypocrea*. Tomuto druhu houby se ve světě nyní věnuje velká pozornost výzkumníků, intenzivně pracujících na izolaci mutantů, jejich sekvenování atd., s perspektivou použití v nejrůznějších aplikacích na úseku biotechnologií.

2. Zatahování sáčků s navážkou vzorku k inkubaci na tvar „biskupské čepice“ (viz obr. 1) průkazně ($P_{0,99}$) zvyšuje pepsin-celulóзовou rozpustnost organické hmoty, přičemž se stanovená hodnota ELOS velice těsně přibližuje hodnotě OMD *in vivo* (viz předchozí kapitola). Ověření jsme provedli na souboru 8 vzorků píce, ve 3 opakováních, kdy průměr ELOS u „biskupských čepic“ (= x) činil 67,7 a při svaření sáčků „na plocho“ (= y) 52,6.
Korelační koeficient $r = 0,980 \pm 0,016$.

3. Zařízení Ankom Daisyll, s originálními sáčky F57 lze s výhodou použít i k rutinnímu stanovení ELOS, třebaže výrobce a dodavatel s přístrojem dodávají pouze metodiku, při které se používají bachorové šťávy. Náš ověřený postup stanovení se tak dává k volnému použití obci potenciálních uživatelů zařízení.

IV Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro zemědělskou praxi, poradce v oblasti zemědělství, pracovníky ve výzkumu, zemědělském školství a šlechtění. Pro její využití byla uzavřena smlouva se Svazem marginálních oblastí se sídlem Horní Police č. 1. SMO doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

V Seznam použité související literatury

- Adesogan, A. T. – Givens, D. I. – Owen, E., 1998, Prediction of the in vivo digestibility of whole crops wheat from in vitro digestibility, chemical composition, in situ rumen degradability, in vitro gas production, and near infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Fd Sci Technol.*, 74: 259 – 272.
- Dowman, M. G. – Collins, F. C., 1982, The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds. *J. Sci Fd Agr.*, 33: 689 – 696.
- Forejtová J. et al., 2005, Comparison of organic matter digestibility determined by in vivo and in vitro methods. *Czech J. Anim. Sci.*, 50, (2): 47-53.
- Jones, D. H. I. – Theodorou, M. K., 2000, Enzyme techniques for estimating digestibility. In: D. J. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford, H. M. Ohmed (eds): *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CAB Int., Wallingford, U.K.: 155 – 173.
- Kalač, P. - Míka, V., 1997, Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. ÚZPI Praha, 325 s.
- Míka, V. – Paul, Ch. – Zimmer, E. – Kaufmann, W., 1982, Stanovení stravitelnosti objemných krmiv. *Živ. Vyr.*, 27: 409 – 416.
- Míka, V. a kol., 1997, *Kvalita píce*. ÚZPI Praha, 227 s.
- Tilley, J. M. A. – Terry, R. A., 1963, A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.*, 18: 104 – 111.
- Zeman, L. a kol., 2006, *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. Profi Press, Praha, 360 s.

VI Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány (pokud existují), případně výstupy z určité znalosti, jestliže se jedná o originální práci

- Míka, V. – Paul, Ch. – Zimmer, E. – Kaufmann, W., 1981, Ein Vergleich verschiedener Labormethoden zur Schätzung der Verdaulichkeit von Grundfutter. Zt. f. Tierphysiol., Tierernährung u. Futtermittelkde, 45, 3: 132 – 141
- Míka, V., 1983, The use of the ONOZUKA 3S cellulase preparation for predicting the organic matter digestibility (OMD) of fodder crops. Sci Agric. Bohemoslova-ca, 15, 3: 183 – 188
- Míka, V., 1985, Prognoz převarimosti organičeskogp věščestva po rastvorimosti prob svěžeskošennych kormovych rastěnij v cellulolytičeskych srědach. Sělskochoz. Biol., (Moskva), č. 9: 46 – 48
- Míka, V., 1989, Hodnocení kvality píce ve šlechtění trav. Doktor. dis. práce, VŠÚP Troubsko u Brna, I. díl, 316 s.

VII Příloha: Metody stanovení celulózových preparátů

Příl. 1: FPA aktivita (EC 3.2.1.91 - filter paper activity)

Princip:

Množství redukujících látek (RL) vytvořených působením celulózy na filtrační papír Whatman 1 se stanoví reduktometricky podle Nelsona (NELSON, N., 1944, J. Biol. Chem., 153: 375).

Definice jednotky:

1 jednotka (U) FP aktivity je takové množství enzymu, které uvolní z filtračního papíru za 1 minutu takové množství redukujících látek, které odpovídají 1 μ molu glukózy (za podmínek metody).

Chemikálie a roztoky:

- substrát: filtrační papír Whatman No 1

- 0,05 M citrátový pufr, pH 4,8
- Roztok enzymu nebo kultivační kapaliny
- Somogyiho činidlo: těsně před použitím se smíchá roztok A a B v poměru 25:1 obj.

Roztok A: 25 g Na_2CO_3 (bezvodý), 25 g Seignettovy soli (tj. vinanNaK), 200 g Na_2SO_4 (bezvodý) se rozpustí ve vodě za tepla. Po vychlazení se doplní destilovanou vodou do 1 000 ml. Roztok se uchovává při 20 °C.

Roztok B: 15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v dest. vodě, doplní do 100 ml dest. vodou a přidají se 2 kapky konc. H_2SO_4 .

- As-Mo činidlo: 25 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (molybdenan amonný) se rozpustí za tepla ve 450 ml vody. Po ochlazení se přidá 18 ml konc. H_2SO_4 a roztok arseničnanu sodného (3 g $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ve 25 ml vody). Směs se inkubuje 24 h při 37 °C. Činidlo se uchovává v tmavé lahvi.

Postup stanovení: 50 g (na 0,0001 g) filtračního papíru Whatman 1 (např. obdélníček 1x6 cm) se vloží do zkumavky obsahující 1 ml citrátového pufru (0,05 M; pH 4,8) a 1 ml vhodně zředěného vzorku enzymu. Zkumavka se zazátkuje a inkubuje 1 h při 50 °C. Pak se inkubační směs slije (do jiné zkumavky) a 1 ml tohoto roztoku se přidá k 1 ml Somogyiho činidla, dobře se promíchá a vaří 15 minut ve vroucí vodní lázni. Po ochlazení se přidá 1 ml As-Mo činidla, roztok dobře promíchá a nechá 5 minut stát. Poté se doplní do 10 ml dest. vodou, promíchá a měří se absorbance (extinkce) při 500 nm v 1 cm kyvetě. Vzorek enzymu se ředí tak, aby naměřená absorbance byla v rozmezí 0,120 – 0,250.

Slepý pokus:

Provádí se stejným způsobem, ale bez filtračního papíru (1 ml citrátového pufru + 1 ml vhodně ředěného enzymu).

Kalibrační křivka:

1 ml roztoku glukózy a 1 ml Somogyiho činidla se vaří 15 minut ve vroucí vodní lázni. Po ochlazení se přidá 1 ml As-Mo činidla, promíchá a nechá se stát 5 minut. Poté se roztok doplní do 10 ml dest. vody, promíchá a měří absorbance při 500 nm. Slepý pokus se připraví stejně, ale místo roztoku glukózy se přidá 1 ml dest. vody.

Koncentrační rozmezí kalibrační křivky je 0,05 – 0,35 mg glukózy v ml.

Výpočet:

$$\text{mg RL/ml} = G \cdot d \cdot 2$$

$$\text{U/ml} = G \cdot d \cdot 2 \cdot 1000/60 \cdot 180 = G \cdot d \cdot 2 \cdot 0,0925$$

- RL = redukující látky
- G = mg glukózy odečtené z kalibrační křivky
- D = zředění vzorku před inkubací
- 2 = zředění vzorku během stanovení
- 1000 = přepočet na μg
- 60 = přepočet za 1 minutu
- 180 = přepočet na μmol glukózy

Příl. 2: C_x aktivita (EC 3.2.1.4. - karboxymethylcelulázová aktivita)

Princip metody:

Množství redukujících látek uvolněných konverzí karboxymethylcelulózy enzymem se stanovuje reduktometricky podle Nelsona (viz příl. 1).

Definice jednotky:

1 jednotka celulázové aktivity je takové množství enzymu, které uvolní z CMC-Na za 1 minutu takové množství redukujících látek, které odpovídají 1 μmolu glukózy (za podmínek metody).

Roztoky a chemikálie:

- * 1,0 M acetátový pufr, pH 5,5 (Na)
- * Substrát: 0,625 g CMC-Na (sodná sůl karboxymethylcelulózy) se rozpustí za stálého míchání při 60 °C. Po ochlazení se přidá 10 ml 1,0M acetátového pufru, pH 5,5 a roztok se doplní dest. vodou na 100 ml.
- * Somogyiho činidlo: viz příl. 1
- * As-Mo činidlo: viz příl. 1

Postup stanovení:

4 ml 0,625 % roztoku CMC-Na se nechá 5 minut inkubovat ve vodní lázni termostatu při 40 °C. Pak se přidá 1 ml vzorku enzymu (vhodně ředěného) a inkubuje se 30 minut při 40 °C. Poté se reakce zastaví přidávkem 1 ml Somogyiho činidla, promíchá se a vaří 20 minut ve vroucí vodní lázni. Po ochlazení se přidá 1 ml As-Mo činidla, nechá se 5 minut stát, dobře se promíchá a doplní do 25 ml dest. vodou.

Měří se absorbance při 500 nm v 1 cm kyvetě.

Slepý pokus:

Provádí se stejným způsobem, ale vzorek se přidává až po inkubaci a přidávku Somogyiho činidla. Relativně nejnižší rozptyl naměřených hodnot je v rozmezí absorbance 0,120 – 0,250.

Kalibrační křivka:

Glukóza (1 ml) v koncentračním rozmezí 0,05–0,3 mg/ml, 4 ml dest. vody, 1 ml Somogyiho činidla se vaří 20 minut; dále je pokus stejný jako při vlastním stanovení (viz výše).

Slepý pokus je připraven stejným způsobem, ale místo glukózy se pipetuje 1 ml dest. vody.

Výpočet:

$$U/ml = G \cdot d \cdot 1000/30 \cdot 180 = G \cdot d \cdot 0,185$$

U = mezinárodní jednotky celulázové aktivity

G = mg glukózy odečtené z kalibrační křivky

D = ředění enzymu před inkubací

1000 = přepočet na μg
30 = přepočet za 1 minutu
180 = přepočet na μmol glukózy

Příl. 3: C_1 aktivita (aktivita celuláz štěpících nerozpustný substrát) podle Záv. zpr. Výzk. úk. G-0-29-64, ČAZ-VÚPP Praha (1970)

Princip metody:

Aktivita celuláz štěpících nerozpustný substrát se stanoví z rozdílu hmotnosti nerozpustného substrátu před a po inkubaci s enzymem.

Definice jednotky:

Jedna jednotka aktivity celuláz je takové množství enzymu, které v objemu 100 ml je schopno rozpustit z 1000 mg nerozpustné celulózy 1 mg.

Roztoky:

2N NH_3 (149,6 ml/1 litr 25 % NH_3OH)

2N CH_3COOH (114,4 ml/1 litr)

0,1N acetátový pufr , pH 5,5

Substrát:

Buková mikrokrytalická celulóza, chemicky čistá, se promyje na skleněném filtru S3 30 ml 2N NH_3 a 30 ml 2N CH_3COOH a ca 250 ml dest. vody. Pak se suší při 80 °C po dobu 15 h.

Postup stanovení:

100 ml enzymu v pufru (pH 5,5) a 1 g substrátu (celulózy) se inkubuje ve 100 ml baňkách v termostatu při 40 °C po dobu 7 dní. Případné infekci se zabrání přídávkem 0,2 ml toluenu. Po skončení inkubace se obsah baňky přefiltruje přes filtr S3. Zbytek celulózy na filtru se promyje

ca 200 ml dest. vody, 30 ml 2N NH₃ a 30 ml 2N CH₃COOH a ca 250 ml dest. vody. Pak se vysuší při 80 °C 15 h a zvážením zjistí úbytek hmotnosti substrátu.

Slepý pokus:

- a/ korekce na nerozpustný zbytek ve vzorku bez přítomnosti celulózy (a):
Po odstředění kultivační kapaliny po fermentaci při dlouhém stání supernatantu může vznikat pouze fyzikálně-chemickým způsobem sraženina, která neprochází filtrem. Hmotnost této sraženiny může zkreslit výsledek stanovení. Korekce (a) je vyjádřena v mg. Ke stanovení se bere: 100 ml roztoku enzymu v pufru a 0,2 ml toluenu se inkubuje 7 dní při 40 °C. Dále je postup stejný jako u vzorků s enzymem.
- b/ korekce na nerozpustné látky v celulóze (b):
Samotná celulóza inkubovaná v pufru po delší dobu může vykazovat úbytek hmotnosti. Tento úbytek by mohl zkreslit výsledek stanovení. Korekce (b) je opět vyjádřena v mg.
Vypočítává se takto:
 $b = 1000 - \text{hmotnost celulózy po 7denním vyluhování v pufru}$
Ke stanovení se bere: 100 ml acetátového pufru, 1 g celulózy a 0,2 ml toluenu se inkubuje 7 dní při 40 °C. Ostatní postup je stejný jako u vzorku s enzymem.

Výpočet:

$$J = G + a - b$$

kde

G = úbytek hmotnosti substrátu působením celuláz (v mg)

1 000 – hmotnost celulózy po inkubaci (v mg)

a = korekce na nerozpustný zbytek ve vzorku bez přítomnosti celulózy

b = korekce na nerozpustné látky v celulóze

Příl. 4: 1,4 (1,3) β-glukanázová aktivita (EC 3.2.1.73)

Princip metody:

0,5% β-glukanový substrát (lichenin nebo jiný β-glukan) je vysta-

ven působení enzymu a uvolněné redukující látky (sacharidy) se stanoví spektrofotometricky podle Bernfelda. Současně se provádí korekce na 1,4- β -glukanázu (EC 3.2.1.4) stejným způsobem, avšak substrátem je 0,5% roztok Na-karboxymethylcelulózy.

Redukující sacharidy uvolněné působením enzymu na karboxymethylcelulózu se odpočítají od hodnoty redukujících sacharidů uvolněných z β -glukanového substrátu.

Pozn.: Jelikož u většiny preparátů se enzymatická složka celulázového komplexu degradující CMC neuplatňuje příliš výrazně za podmínek optimálních pro konverzi 1,4 (1,3) β -glukanu, je možno ve většině případů zanedbat tzv. korekci na CMC.

Definice jednotky:

Jedna mezinárodní jednotka (IU) β -glukanázové aktivity je takové množství enzymu, které uvolní z β -glukanového substrátu 1 μ mol glukózy za 1 minutu za podmínek metody stanovení.

Chemikálie a roztoky:

- 0,05 M citrátový pufr, pH 5,5
- 2 N NaOH
- Substráty – lichenin nebo ječný β -glukan (Biocon). 0,5% roztok v 0,05 M citrátovém pufru, pH 5,5 CMC (Na-karboxymethylcelulóza). 0,5 %ní roztok v 0,05 M citrátovém pufru, pH 5,5
- kyselina 3,5-dinitrosalicylová (DNS).

Příprava DNS činidla:

30 g vinanu sodnodraselného se rozpustí za horka v 50 ml des. vody. 1 g kys. 3,5-dinitrosalicylové rozpouštíme za horka v 20 ml 2 N NaOH. Po částečném rozpuštění přidáme horký roztok vinanu Na-K a dále zahříváme. Po dokonalém rozpuštění ochladíme a doplníme na 100 ml dest. vodou.

- standardní glukózový roztok pro stanovení kalibrační křivky

Postup stanovení:

0,5 ml substrátu (A – 0,5% lichenin nebo ječný β -glukan, B – 0,5% CMC). Temperujeme asi 5 minut při 40 °C ve vodní lázni ultratermostatu,

pak přidáme 0,5 ml vhodně ředěného vzorku enzymu a směs inkubujeme 30 minut při 40 °C. Reakci zastavíme přidáním 1 ml DNS činidla a vaříme 5 minut ve vodní lázni. Po ochlazení doplníme do 10 ml dest. vodou. Na spektrofotometru změříme absorpenci červenohnědého roztoku při 530 nm proti dest. vodě v 1 ml kyvetách.

Slepý pokus:

Provádí se stejným způsobem, ale vzorek se přidá až po inkubaci a přidavku DNS činidla (pro oba substráty).

Kalibrační křivka:

1 ml standardních roztoků glukózy v koncentrační řadě 0,0 – 0,9 mg/ml (0,0 – 5,0 μmol/ml), 1 ml dest. vody a 2 ml DNS činidla vaříme 5 minut ve vodní lázni. Po ochlazení doplníme do 20 ml a změříme absorpenci červenohnědých roztoků stejným způsobem jako při vlastním stanovení.

Výpočet:

$$A = (G_A \cdot d_A - G_B \cdot d_B) \cdot 1000 / 30 \cdot 180$$

nebo

$$A = G_A \cdot d_A \cdot 1000 / 30 \cdot 180, \text{ pokud nebereme v úvahu korekci na CMC.}$$

kde

A = 1,4 (1,3) β-glukanázová aktivita preparátu vyjádřená v mezinárodních jednotkách (IU)

G_A = mg glukózy odečtené z kalibrační křivky po konverzi 1,4 (1,3) β-glukanu

G_B = mg glukózy odečtené z kalibrační křivky po konverzi CMC

d_A = ředění enzymatického preparátu po konverzi 1,4 (1,3) β-glukanu

d_B = ředění enzymatického preparátu po konverzi CMC

Příl. 5: xylanázová aktivita (EC 3.2.1.32 – endo 1,3 – β-xylanáza)

Princip metody:

Množství redukujících látek uvolněných ze xylanu působením hemice-lulázy (xylanázy) se stanoví reduktometricky podle Bernfelda.

Definice jednotky:

1 mezinárodní jednotka (IU) xylanázové aktivity je takové množství enzymu, které uvolní za 1 minutu ze substrátu takové množství koncových redukujících skupin, které je ekvivalentní 1 μ molu xylózy za podmíněk metody.

Chemikálie a roztoky:

- 0,1 M acetátový pufr, pH 5,0
- xylanový substrát (1 %ní): 0,1 g xylanu se rozmíchá asi v 7 ml acetátového pufru, pH 5,0. Povaří se 10 minut na vodní lázni a po ochlazení se doplní na 10 ml týmž puftrem.
- kyselina 3,5-dinitrosalicylová. Příprava DNS činidla je popsána v příl. 4.
- vinan sodnodraselný
- 2M hydroxid sodný (8 g NaOH/100 ml)

Postup stanovení:

0,5 ml xylanového substrátu temperujeme asi 5 minut ve vodní lázni ultratermostatu při 40 °C. Poté se přidá vhodně naředěný roztok enzymu a inkubuje se 30 minut při 40 °C. Enzymatická reakce se přeruší přidávkem 2 ml DNS činidla. Po přidání 1 ml dest. vody se vaří ve vodní lázni 5 minut a poté se ihned ochladí pod tekoucí vodou. Po doplnění na 24 ml dest. vodou se obsah zkumavky dobře promíchá a měří se červenohnědé zbarvení na spektrofotometru při 530 nm v kyvetách 1 ml.

Slepý pokus:

Provádí se stejným způsobem, ale vzorek se přidá až po přidání DNS činidla.

Z kalibrační křivky se odečtou mg xylózy odpovídající změřenému rozdílu absorbcí vzorku a slepého pokusu.

Kalibrační křivka:

Provádí se stanovením redukující schopnosti standardních rozto-

ků xylózy v rozmezí koncentrací 0,0–1,5 mg/ml (5 minutový var roztoku 0,5 ml xylózy, 1,5 ml dest. vody a 2 ml DNS činidla. Ochlazení a doplnění do 24 ml dest. vodou.proměření absorbancí při 530 nm).

Pozn.: Relativně nejmenší rozptyl výsledků je v rozmezí absorbancí 0,150 – 0,220.

Výpočet:

$$\text{aktivita xylanázy (IU)} = X \cdot d \cdot 1000 / 30 \cdot 150$$

kde

IU = mezinárodní jednotky xylanázové aktivity (μmol xylózy/minutu)

X = mg xylózy odečtené z kalibrační křivky

d = ředění vzorku enzymu

1000 = převod na μmol xylózy

30 = převod na 1 minutu

Příl. 6: celobiázová aktivita (EC 3.2.1.21 – β-glukosidáza)

Princip metody:

Glukóza uvolněná z celobiózy působením celobiázy se stanoví enzymaticky soupravou Bio la test OXOCROM GLUKOSA (princip: GOD-POD-chromogen).

Definice jednotky:

1 mezinárodní jednotka (IU) celobiázové aktivity je takové množství enzymu, které odštěpí z celobiózy 1 μmol glukózy za 1 minutu za podmínek metody.

Roztoky:

- 0,2 M acetátový pufr, pH 5,0
- 5 %ní roztok celobiózy v dest. vodě

- 20 % ní roztok kyseliny trichloroctové (TCA)
- Bio-la-test OXOCHROM GLUKOSA (Glu-GP), obsahující:
 - a/ činidlo 1: enzymy glukózaoxidáza a peroxidáza
 - b/ činidlo 2: pufr-chromogen: fosfátový pufr, pH 8,0, 3-methylfenol, 4-amino-phenazon.

Příprava pracovního roztoku OXOCHROMU:
Činidlo 1 se rozpustí v 6 ml dest. vody a přidá k činidlu 2. Po promísení a rozpuštění se přefiltruje. Takto připravené činidlo se uchovává v temnu při +10 °C a je stálé asi 1 měsíc.
- Bio-la-test SOLUNORM GLUKOSA (Sono G1) obsahuje standardní roztok glukózy, koncentrace 5 μmol/ml

Postup stanovení:

- a/ enzymatická konverze celobiózy:
0,3 ml pufru + 0,3 ml příslušně ředěného vzorku celobiázy se temperuje asi 5 minut při teplotě 40 °C. Pak se přidá 0,3 ml 5% roztoku celobiózy a inkubuje 15 minut při 40 °C. Enzymatická reakce se zastaví přidáním 0,3 ml TCA. Dobře protřepat! Slepý pokus se provádí souběžně, ale vzorek celobiózy se přidává až po TCA.
- b/ stanovení glukózy ve směsi po inkubaci:
3 ml pracovního roztoku OXOCHROMU se temperují asi 5 minut při 37 °C, pak se přidá 0,3 ml vzorku (směsi po inkubaci); inkubuje se 15 minut při 37 °C. Poté se změří absorbance na spektrofotometru při 490 nm v 1 cm kyvetách, nejpozději do 30 minut po ukončení inkubace. Vzorek celobiázy se ředí tak, aby změřená absorbance měla hodnotu kolem 0,200, kdy je chyba způsobená případnou inhibicí enzymu glukózou aj. faktory nejmenší. Stejně se postupuje při stanovení standardního roztoku glukózy (roztok Sono G1, ředěný 10x; výsledná koncentrace 0,5 μmol/ml), slepého pokusu a kontrolního vzorku (s dest. vodou místo vzorku).

Výpočet:

Celobiázová aktivita vzorku

$$(IU) = (A_1 - A_{sl.p.}) / (A_2 - A_{vod.}) \cdot d 0,5 \cdot 4 / 15$$

kde

IU = mezinárodní jednotky celobiázové aktivity (μmol glukózy/minutu)

A_1 = absorbance vzorku

$A_{\text{sl.p.}}$ = absorbance slepého pokusu

A_2 = absorbance standardu glukózy

A_{vod} = absorbance kontrolního vzorku s dest. vodou

D = ředění vzorku celobiázy

0,5 = koncentrace standardního vzorku glukózy ($\mu\text{mol/ml}$)

4 = zředění při stanovení glukózy

15 = přepočít na 1 minutu

Autoři: Ing. Václav Míka, DrSc., Ing. Alois Kohoutek, CSc.,
Ing. Pozdíšek Jan, CSc., Ing. Petra Němcová

Název: **Stanovení ELOS (enzymaticky rozpustné organické hmoty) v píci s využitím tuzemských celuláz z *Trichoderma reesei***

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.,
Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně

Redakce a sazba: Ing. Vladimír Pokorný, CSc.

Tisk: Ústav zemědělské ekonomiky a informací
Slezská 7, 120 56 Praha 2

Autor fotografií: Ing. Alois Kohoutek, CSc.

Kontakt na autory: vste@seznam.cz

Náklad: 200 ks

Vyšlo v roce 2009

Vydáno bez jazykové úpravy

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 2009

ISBN 978-80-87011-54-6

Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.
v Ústavu zemědělské ekonomiky a informací
Slezská 7, 120 56 Praha 2

2009