

# 反芻動物飼料試管乾物質消化率 (IVDMD) 方法之修改<sup>(1)</sup>

李春芳<sup>(2) (4)</sup> 蕭宗法<sup>(3)</sup>

收件日期：95年12月28日；接受日期：96年3月12日

## 摘要

兩段式試管乾物質消化率 (*in vitro* dry matter digestibility, IVDMD)，是一項公認與反芻動物飼料活體消化率相關高的實驗室方法，其包括48 h瘤胃微生物發酵與48 h胃蛋白酶消化，但一批次測定會跨越兩週時間，因此本試驗目的在探討如何修改第二階段胃蛋白酶的消化流程，以提升營養評估的工作效率。收集牧草、副產物及精料三類飼料進行試驗。試驗一比較胃蛋白酶消化時間之影響，包括24 h、30 h及48 h（對照組）三處理，得知縮短消化時間會顯著降低消化率（ $P = 0.02$ ）。試驗二在胃蛋白酶消化24 h設定下，比較胃蛋白酶濃度之影響，得知胃蛋白酶1倍（5%）的消化率與對照組相近，而2倍濃度（10%）有提升消化率之趨勢（ $P = 0.06$ ）。試驗三再增加胃蛋白酶濃度1.2倍（6%）處理，四處理組48 h + 48 h（5%，對照組）、48 + 24（5%）、48 + 24（6%）及48 + 24（10%）之IVDMD相近，依序為62.9%、62.8%、63.2%與63.4%。綜合試驗結果建議，IVDMD第二階段之消化時間可以修改為24 h，並使用6%酵素濃度。兩項修改可以達到一週（五個工作天）完成一批次完整測定的目標，顯著提升IVDMD營養評估工作效率達50%。

關鍵詞：試管乾物質消化率、消化時間、胃蛋白酶濃度。

## 緒言

以動物進行飼料營養價值評估是相當昂貴的，它須要維持相當數量的動物族群、畜舍、試驗期間長、人員的管理照顧、多量的測試飼料、繁重的代謝樣品收集及化學分析工作等，因此多數研究室以與活體消化率相關高的實驗室方法取代，如瘤胃微生物發酵方法（Tilley and Terry, 1963; Goering and van Soest, 1970）、瘤胃原位技術 (*in situ* technique)（Nocek, 1988; Huntington and Givens, 1995）及酵素消化（de Boever *et al.*, 1986）等。Tilley and Terry（1963）的試管乾物質消化率 (*in vitro* dry matter digestibility, IVDMD)，即是利用瘤胃微生物及胃蛋白酶，模擬反芻動物

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1355號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(4) 通訊作者，E-mail：cflee@mail.tlri.gov.tw。

前胃消化的一種實驗室評估方法，其與活體消化的高相關性已確認 (van Soest, 1994)，因此被廣泛得用於反芻動物飼料的營養價值評估工作上。

兩段式IVDMD方法包括第一階段48 h的瘤胃微生物發酵與第二階段48 h的胃蛋白酶消化，每批測定自準備、培養、過濾、烘乾到結果討論，會超過一週五個工作天，同時培養期間每日需要人工振盪與觀察，因此經常是兩週才能進行一批次評估試驗，也相當耗時。本試驗目的，即在探討縮短第二階段胃蛋白酶消化時間的方法，以期提升營養評估工作效率。

## 材料與方法

### I. 兩段式試管乾物質消化率測定流程

本試驗以Tilley and Terry (1963) 的兩段式IVDMD方法為基礎，並經李等 (1984) 修正後為對照組。兩頭瘤胃開窗荷蘭乾乳牛提供瘤胃微生物，牛隻飼糧固定為每日3 kg的乾乳牛精料及任食的盤固乾草，經兩週以上的飼養以穩定瘤胃微生物族群。培養當日，於早上精料餵飼前採集瘤胃腹囊內容物，以攪拌機高速一分鐘打碎與八層紗布過濾後，與已經CO<sub>2</sub>充氣30 min的人工唾液 (McDougall, 1949)，以1:4 (v/v) 比例混合成培養菌液。秤取 0.5 g 烘乾粉碎的樣品入有本生瓣 (Bunsen valve) 瓶塞的100 mL試管發酵瓶，加入50 mL培養菌液，在39°C水浴槽中進行48 h的厭氧培養。第三天上午以20% HCL逐步酸化至pH約 1.2，加入2 mL的5%胃蛋白酶溶液 (pepsin, porcine, Sigma P-7000, 1:10,000，取5 g胃蛋白酶以蒸餾水攪拌溶解成100 mL溶液)，繼續消化48 h。第五天上午過濾至已烘乾秤重之玻璃坩鍋，隔夜105°C烘乾，秤重計算得IVDMD，每批次測定同時包括空白樣品與參考樣品。此IVDMD流程為對照組，以48 + 48 (5%) 表示，數字表示兩階段培養時間，括號內數字表示胃蛋白酶濃度。

### II. 培養時間對盤固乾草IVDMD之影響

為瞭解IVDMD培養時間對牧草消化率的影響，以16次盤固草肉公牛活體消化試驗 (保存方式、成熟度) 之盤固乾草 (李等, 2004) 進行分析，每次活體消化試驗有四到五個盤固草樣品，取其IVDMD平均值表示；培養時間處理則包括單獨瘤胃微生物培養12 h、24 h、36 h、48 h及72 h，以及瘤胃微生物培養48 h後再以胃蛋白酶消化24 h及48 h等七種培養處理。

### III. 胃蛋白酶消化流程的修正

#### (i) 試驗一

為較廣泛的涵括飼料種類，採集牧草、副產物及穀類精料為測試樣品，包括盤固草、青割玉米、狼尾草、苜蓿乾草、脫水苜蓿粒、啤酒粕與兩種乳牛精料等八個飼料樣品，探討縮短胃蛋白酶培養時間對IVDMD之影響，培養時間處理有24 h、30 h與48 h，因此試驗處理分別為對照組48+48 (5%)、48+24 (5%) 及48+30 (5%)。試驗重複一次。

#### (ii) 試驗二

採集盤固草、青割玉米、苜蓿乾草、啤酒粕與乳牛精料六種飼料樣品，探討胃蛋白酶培養時間與濃度對IVDMD之影響，培養時間處理有24 h與48 h，酵素濃度處理有5%及10%，因此試驗三處理分別為對照組48+48 (5%)、48+24 (5%) 及48+24 (10%)，(10%) 表示兩倍的胃蛋白酶濃度，即10 g胃蛋白酶溶成100 mL溶液。試驗重複一次。

## (iii) 試驗三

由試驗二結果推算，再加入1.2倍胃蛋白酶濃度處理，即6%，探討胃蛋白酶培養時間與濃度對IVDMD之影響。以試驗二同樣飼料樣品進行四處理比較，分別為對照組48+48（5%）、48+24（5%）、48+24（6%）及48+24（10%）。試驗重複一次。

## IV. 統計分析

各處理所得IVDMD數據，以SAS（1999-2000）一般線性模式（general linear model, GLM）及最小平方均值（least square means, LSM）進行差異性分析，顯著差異水準訂為5%。

## 結果與討論

在應用兩段式IVDMD方法評估飼料消化率時，為配合各研究計畫的目的，IVDMD方法或有些修改，如在探討烘乾溫度對高單寧酸含量牧草纖維分析與IVDMD影響時，IVDMD瘤胃發酵時間增加到72 h（Palmer *et al.*, 2000）；第二段胃蛋白酶消化常被中洗液消化取代，而得到試管乾物質真消化率（*in vitro* true dry matter digestibility, IVTD, Goering and van Soest, 1970; ANKOM TECHNOLOGY, 2005）；或者在探討牧草物理特性及組成與消化率的相關性時，取消了第二段胃蛋白酶消化流程（Mir *et al.*, 1995），本研究則以修改胃蛋白酶消化的時間與濃度為探討方向。

以對照組48+48（5%）的IVDMD值（56.63%）為100%計算，16批盤固草IVDMD受培養時間與胃蛋白酶影響之趨勢，繪於圖1。隨著瘤胃微生物培養時間的增加，IVDMD隨之增加，瘤胃微生物

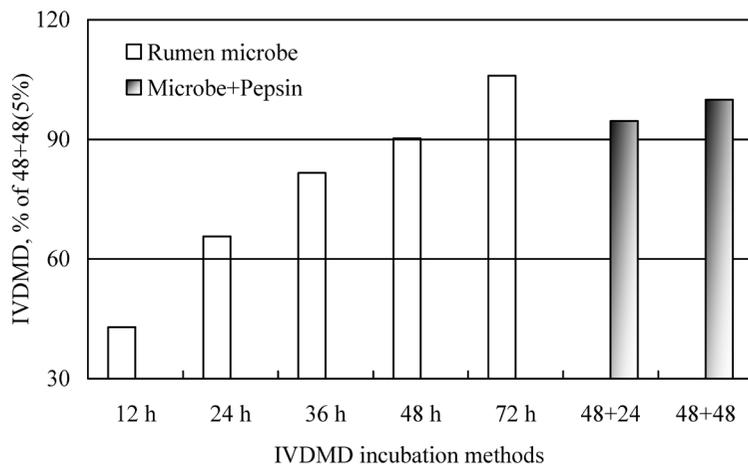


圖 1. 瘤胃微生物發酵時間與胃蛋白酶處理對盤固草試管乾物質消化率的影響。

Fig. 1. Effects of digestion period of rumen microbe and pepsin addition on *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of pangolagrass hay. IVDMD values of 12 h, 24 h, 36 h, 48 h and 72 h digestions were by rumen microbe only. A 48 h rumen microbe digestion was followed by 24 h or 48 h (set as 100%) pepsin digestion.

物培養時間12 h、24 h、36 h、48 h與72 h的IVDMD值，分別達到對照組的43%、66%、82%、90%及106%；而且盤固草消化速度最快的是在培養12 h到24 h的1.07%/h，其後依序減緩為0.75%/h、0.41%/h及0.37%/h。胃蛋白酶消化48 h，可以增加10%的IVDMD值，24 h可以增加5%的IVDMD值。同時，在探討各種IVDMD方法與活體消化率相關性時，有胃蛋白酶消化的處理可以明顯提高與活體消化率的相關，如24、48、48+24（5%）、48+48（5%）與活體乾物質消化率之相關係數分別為0.71、0.88、0.93與0.92（未發表之研究結果）。試驗結果顯示，高纖禾本科牧草之消化以瘤胃微生物為主，而胃蛋白酶消化仍有促進之效果。

在胃蛋白酶消化流程的修正方面，試驗一比較胃蛋白酶消化24 h、30 h與48 h之差異，個別飼料測定結果繪於圖2，統計結果顯示消化時間的確會顯著影響飼料的消化率（表1），三處理的

表 1. 胃蛋白酶消化時間與濃度對反芻動物飼料試管乾物質消化率的影響

Table 1. Effects of digestion period (h) and level (%) of pepsin on *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of ruminant feed ingredients

Trial	IVDMD, %					SEM	P-value
	48+48(5%) <sup>1</sup>	48+24(5%)	48+24(6%)	48+24(10%)	48+30(5%)		
I	63.55 <sup>a</sup>	62.85 <sup>ab</sup>			62.53 <sup>b</sup>	0.25	0.02
II	62.69	62.54		63.70		0.36	0.06
III	62.87	62.82	63.21	63.38		0.35	0.62

<sup>1</sup> Treatments were expressed as first microbial fermentation period plus second pepsin digestion period with pepsin level in the parenthesis.

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different superscripts differed significantly ( $P < .05$ ).

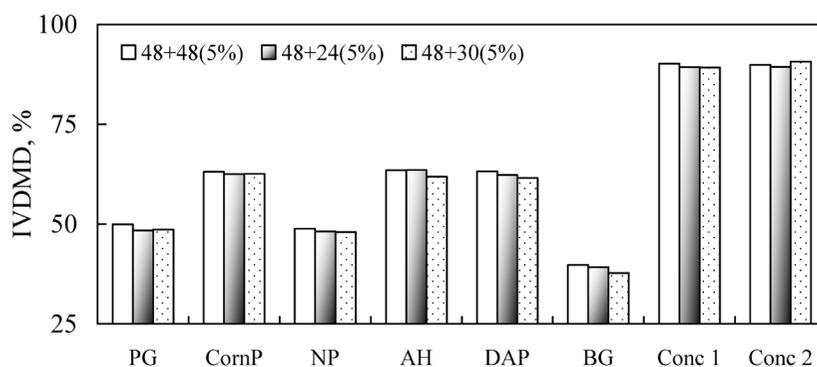


圖 2. 胃蛋白酶消化時間對反芻動物飼料試管乾物質消化率的影響（試驗一）。

Fig. 2. Effect of digestion period (h) of pepsin on *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of ruminant feed ingredients (Trial I). PG: pangolagrass, CornP: corn plant, NP: napiergrass, AH: alfalfa hay, DAP: dehydrated alfalfa pellet, BG: brewer's grains, Conc: concentrate.

LSM分別為62.85%、62.53%與63.55% ( $P < 0.05$ )，消化30 h之消化率顯著低於對照的48 h，主要源自苜蓿乾草與啤酒粕樣品之差異，原因不甚清楚；消化24 h與48 h之差異也已接近5%顯著水準 ( $P = 0.051$ )，顯示單純縮短胃蛋白酶消化時間並不適宜，此與前盤固草試驗結果有一致性。試驗二在設定胃蛋白酶消化24 h下，探討加倍酵素濃度之效果，個別飼料測定結果繪於圖3。三處理組48+48 (5%)、48+24 (5%)與48+24 (10%)的IVDMD數值分別得到62.69%、62.54%與63.70% ( $P = 0.06$ ，表1)，處理間雖未達到顯著差異水準，但有很強的趨勢顯示胃蛋白酶增加為兩倍濃度時，會提高飼料消化率測定值，因此兩倍濃度可能為偏高的調整。試驗三應用試驗二飼料為測定樣品，並依據試驗二結果推算，再增加胃蛋白酶濃度6%處理，個別飼料測定結果繪於圖4。四處理組48+48 (5%)、48+24 (5%)、48+24 (6%)與48+24 (10%)的IVDMD數值分別得到62.87%、62.82%、63.21%與63.38% ( $P = 0.6$ ，表1)，顯示四處理對IVDMD的影響都相近。

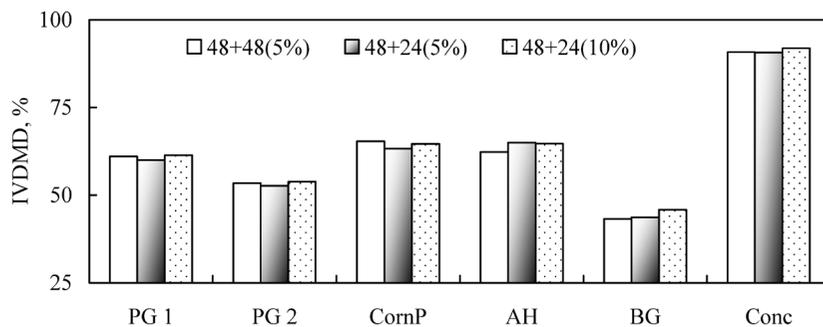


圖 3. 胃蛋白酶消化時間與濃度對反芻動物飼料試管乾物質消化率的影響 (試驗二)。

Fig. 3. Effects of digestion period (h) and level (%) of pepsin on *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of ruminant feed ingredients (Trial II). PG: pangolagrass, CornP: corn plant, AH: alfalfa hay, BG: brewer's grains, Conc: concentrate.

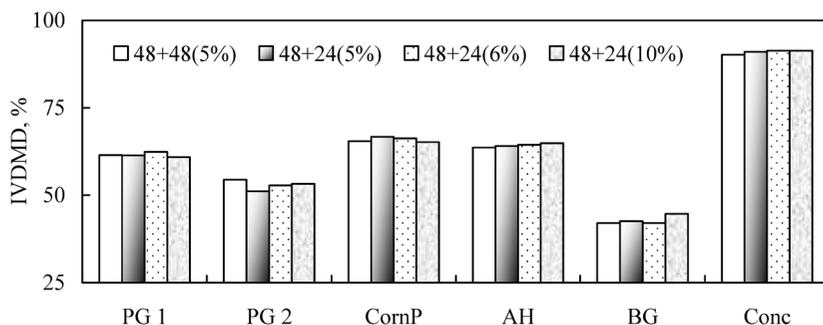


圖 4. 胃蛋白酶消化時間與濃度對反芻動物飼料試管乾物質消化率的影響 (試驗三)。

Fig. 4. Effects of digestion period (h) and level (%) of pepsin on *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of ruminant feed ingredients (Trial III). PG: pangolagrass, CornP: corn plant, AH: alfalfa hay, BG: brewer's grains, Conc: concentrate.

綜合以上試驗結果，建議IVDMD第二階段之消化時間可以修改為24 h，並配合胃蛋白酶濃度增加至6%。兩項修改可以得到與原48+48 (5%) 方法十分相近的消化率數據，同時可以在一週五個工作天內完成一批測定的完整工作，包括樣品準備、培養消化、過濾烘乾、結果討論與下一批試驗方向的確認等，因此以IVDMD評估飼料營養價值的工作效率大幅提升50%，對相關研究工作相當有助益。

## 誌謝

本試驗由助理謝俐潔、陳宛鈴與程雅琴小姐等協助完成，特此致謝。

## 參考文獻

- 李春芳、沈添富、陳茂牆。1984。利用不同方法評估農作副產物之營養價值。中畜會誌13 (3、4) : 35-51。
- 李春芳、蕭宗法、陳吉斌、陳茂牆。2004。盤固草飼養價值評定及分級之探討。中畜會誌33 (4) : 259-270。
- ANKOM TECHNOLOGY. 2005. Operator's Manual DAISY<sup>II-200/220</sup> Incubator. NY., USA.
- de Boever, J. L., B. G. Cottyn, F. X. Buysse, F. W. Wainman, and J. M. Vanacker. 1986. The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 14: 203-214.
- Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agric. Handbook No. 379, ARS-USDA, Washington, DC., USA.
- Huntington, J. A., and D. I. Givens. 1995. The *in situ* technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. Nutr. Abstr. Rev. (Series B), CAB International, 65: 63-93.
- McDougall, E. I. 1949. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43: 99-109.
- Mir, P. S., Z. Mir, K. Broersma, S. Bittman, J. W. Hall. 1995. Prediction of nutrient composition and *in vitro* dry matter digestibility from physical characteristics of forages. Anim. Feed Sci. Technol. 55: 275-285.
- Nocek, J. E. 1988. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. J. Dairy Sci. 71: 2051-2069.
- Palmer, B., R. J. Jones, E. Wina, B. Tangendjaja. 2000. The effect of sample drying conditions on estimated of condensed tannin and fibre content, dry matter digestibility, nitrogen digestibility and PEG binding of *Calliandra calothyrsus*. Anim. Feed Sci. Technol. 87: 29-40.
- SAS. 1999-2000. SAS/STAT User's Guide. Releases 8.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC., USA.
- Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for *In Vitro* digestion of forage crops. J. Brit. Grassland Soc. 18: 104-111.
- van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of Ruminants. 2<sup>nd</sup> edition. Cornell University Press.

# Protocol modification of *in vitro* dry matter digestibility methods for ruminant feed evaluation<sup>(1)</sup>

Churng-Faung Lee <sup>(2)(4)</sup> and Tzong-Faa Shiao <sup>(3)</sup>

Received: Dec. 28, 2006 ; Accepted: Mar. 12, 2007

## Abstract

*In vitro* dry matter digestibility (IVDMD) is a widely recognized laboratory method that highly correlated with *in vivo* digestion. It consists of the first 48-h rumen microbial fermentation and the second 48-h pepsin digestion. Due to the 2-wk length for each complete batch run, it was aimed to modify the pepsin digestion procedure to promote its efficiency in terms of feed nutrition evaluation. Three categories of feed, forages, by-products and grain concentrates, were assayed in this study. In trial I, pepsin digestion period of 24 h, 30 h and 48 h (control) were compared. Simply shortening the period of pepsin digestion would significantly decrease their IVDMD values ( $P = 0.02$ ). In trial II, with 24-h pepsin digestion, effect of increasing pepsin level was studied. It showed that digestibility from 2-fold pepsin level (10%) treatment tended to be higher than control group ( $P = 0.06$ ). In trial III, IVDMD values were similar among four treatments, 48+48 (5% pepsin, control), 48+24 (5%), 48+24 (6%) and 48+24 (10%), and averaged 63.08%. It was suggested that the second stage of IVDMD method could be modified as 24 h in length with 6% of pepsin level. These two modifications make it possible to accomplish one batch IVDMD measurement within one week and thus significantly improve the evaluation efficiency by 50%.

Key words: Digestion period, *In vitro* dry matter digestibility, Pepsin level.

---

(1) Contribution No.1355 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

(3) Animal Industry Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: cflee@mail.tlri.gov.tw

