

1. Bakgrund

Fodervärderingsprojektet NorFor för idisslare har nu lanserat sin modell för foderstatsplanering och optimering (NorFor Plan). För att stöda och förbättra denna modell och för att skaffa kunskap för kommande modeller har Avdelningen för fodervetenskap, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU, har under en längre tid sysslat med utveckling av in vitro-metoder för mätning av olika proteiners och stärkelse typers nedbrytning. Försök har också gjorts att verifiera dessa mätningar in vivo (Hedqvist och Udén, 2006).

Snabba och billiga analyser av fodermedel är också nödvändigt för rådgivare, lantbrukare, fodermedelsindustrin och i forskningen. Nedbrytningsprofiler för protein och stärkelse kostar idag tusentals kronor per prov varav analyserna svarar för en stor del av kostnaden. Lovande resultat, som ännu är opublicerade, har erhållits med infraröd (IR) spektrometri i det centrala (mid-IR) för kvantitativ bestämning av sammansättningen av lösliga ämnen i ensilage.

Det reviderade projekt som redovisas i denna har främst syftat till att utveckla och värdera in vitro-metoder för mätning av stärkelse och lösliga proteiners nedbrytningskinetik. Dessutom studerades möjligheterna att förbilliga analyserna av protein och stärkelse med mid-IR-spektroskopi.

Frågeställningarna i projektet har varit:

- i) Kan vi anta att mätningar av nedbrytningshastigheter in vitro för buffertlösliga (BLP) och för stärkelse är jämförbara med de sanna värdena in vivo och innebär en förbättring gentemot påsmetoden?
- ii) Kan vi reducera kostnaderna för bestämning av fodermedels nedbrytningsprofil och för forskningsanknutna analyser genom att mäta lösliga proteiner och stärkelse i in vitro- och in vivo-prover med mid-IR-teknik?

2. Material och metoder

I Försök 1 studerades nedbrytningsprofilerna för fyra stärkelse- och fyra BLP-källor in vitro och in vivo. In vivo-mätningarna gjordes i totalt fem perioder, varav den första perioden uteslöts pga för låga substratmängder i form av BLP. Period 1 användes inte i vidare databearbetning. Fyra kor ingick i försöket och erhöll fasta kombinationer (behandlingar) av stärkelse- och BLP-källor, som gavs i form av en pulsdos. Alla kor erhöll samtliga behandlingar i en 4*4 romersk kvadrat. Mätningarna in vitro gjordes separat för stärkelse och BLP. I planen ingick fyra upprepningar (perioder) för respektive stärkelse- och proteinkälla. Totalt genomfördes fem upprepningar för protein och sju för stärkelse pga tekniska problem. Av dessa användes samtliga fem för protein, utom Period 3, som gav orimliga värden för rapskaka. För stärkelse uteslöt de tre första perioderna.

Försök 2 gjordes med anledning av resultat från Försök 1, som visade på mer eller mindre ögonblickligt försvinnade av BLP både in vitro och in vivo. Här användes en ny in vitro-metod i makroskala med helt vomnehåll.

2.1. Försök 1

2.1.1. Kor

Fyra sinkor av SRB-ras användes. Djuren var uppbundna i stallet och användes till både in vitro- och in vivo-försöken. Djuren hade permanenta vomfistlar (ID 10 cm) och utfodrades med 4 kg gräshö och 1.75 kg kraftfoder, bestående av (g/kg): rågvete (224), rapsmjöl (150), havre (125), palmkärnmjöl (96), sojamjöl (89), sockerbetspulpa (83), korn (80) och vetefodermjöl (88). Dagsgivan under provtagningsperioderna fördelades på två lika stora

givor, som utfodrades 08:00 och 19:00. Den senare givan gavs efter det att alla vomprover hade tagits.

2.1.2. Substrat

Stärkelsekällorna utgjordes av potatisstärkelse (PS; potatismjöl från Lyckeby Culinar AB, Fjälkinge, Sweden), samma potatisstärkelse gelatiniserad (PSG), vetestärkelse (VS; hushållsvetemjöl från Kungsörnen, Cerealia, Järna, Sweden) och majsstärkelse (MS; Maizena®, Unilever Bestfoods, Helsingborg, Sweden).

Gelatiniseringen av potatisstärkelsen gjordes genom upphettning till 80-85°C i minst 10 minuter under omrörning, varfter den frystorkades och smulades sönder till ett fint pulver med hjälp av en knivmixer.

Ursprunget till de buffertlösliga proteiner var skruvpressad rapskaka (RK), lupiner, vetedranksirap (DS) från Agroetanol AB, Norrköping, Sweden och kasein (bovint kasein, C-5890, Sigma, Saint Louis, MO, USA). BLP från rapskaka och malda lupiner extraherades med en borate-phosphate buffer och frystorkades. Vattenfasen från DS frånskiljdes och frystorkades.

2.1.3. In vitro-studie

Vomvätska uttogs före utfodringen kl. 07:30 h från fyra de vomfistulerade korna och blandades efter filtrering. Stärkelseproverna inkuberades i 0 till 24 h enligt Sveinbjörnsson et al. (2006). Samtidigt, och med samma vomvätska, inkuberades BLP-proverna (4 mg protein-N) i 0 till 4 h (Hedqvist and Udén, 2006). Blankprover, innehållande enbart vomvätska och medium inkluderades för alla substrat och incubationstider. Efter inkubationen av BLP centrifugerades proverna vid 30000 x g under 15 min och 4°C.

2.1.4. In vivo-studie

För att förbättra möjligheterna till provtagning i vommen, gjordes en partiell evakuering på så sätt att ca. 20 kg av det fasta innehållet togs ur vommen. Mängderna som togs ur vommen varierade och evakueringen upphörde först när en tillräckligt flytande konsistens hade uppnåtts, som tillät god omblandning och representativ provtagning. Varje försöksperiod startade på en måndag kl. 12:30. Alla kor erhöll därefter en pulsdos av respective stärkelse-BLP och 1 g CoEDTA (Udén et al., 1980), som vätskemarkör. De stärkelse-BLP-kombinationer som användes utgjordes av PS-kasein, VS-DS, MS-RK or PSG-lupin. Pulsdoserna motsvarade 500 g färskvikt av respektive stärkelsekälla och de genomsnittliga doserna av BSP-N varierade från 6.6 till 9.3 g från de olika proteinkällorna.

Två prover på vominnehållet (ca. 400 och 50 mL) togs under 0 till 4 h (BLP) och 0 till 6 h (stärkelse) efter att först rört om innehållet i vommen manuellt under ca. 30 sek. Den mikrobiella aktiviteten stoppades genom kylning (ca. -25°C) i en blandning av CaCl₂ och krossad is (is bildning förhindrades). Vom-pH mättes varje hel timme. Proverna på 50 mL centrifugerades i 30000 x g, 15 min vid 4°C och supernatanterna frystes.

2.2. Försök 2

Två pilot studier på kaseinets nedbrytning gjordes med en ny typ av in vitro-utrustning (Rörko). Anledning till dessa studier bottnade i oväntat stora förluster av BLP direkt efter start av inkubationerna både in vitro och in vivo (se resultat Försök 1). Urustningen bestod i korthet av uppvärmda frigolitlådor med (mått i cm) ungefärlig y.d. på 120(l) x 60(b) x 75(h) med 2 st. (70(h) x 25(d)) i Försök 2A eller 8 st. (76(h) x 20(d)) rör i Försök 2B, som stack ca 10 cm ovanför locket. Varje rör var förslutet med ett 6-cm tjockt cellgummilock ur vilka änden på omrörningsspiralen (12.5 eller 10(d)) och ett perforerat provtagningsrör (2x90) stack upp. Omrörning av spiralerna drevs av borrmaskiner. En centrerad bult i botten av röret tjänade som styrning. Lådorna hölls normalt uppvärmda i 39°C med cirkulerande luft. Helt vomminnehåll inkuberades med en karbonat-fosfatbuffert.

Försöken utfördes normalt enligt följande. Vomminnehåll togs från en ko och 5 - 6 kg placerades i respektive förvärmade rör, innehållande en del av den avsedda mängden buffert under ett koldioxidtäck. Efter att rören förslutits med lock, tillsattes ytterligare buffert med

eller utan kasein. Det röret som inte fick kasein tjänade som kontroll gentemot det/de andra. Den påföljande första provtagning skedde omedelbart och tillgick så att innehållet först rördes om under 30 sek, varefter de perforerade rören skjöts ner till botten. Den inträngande vätskan sögs upp via ett smalt rör i en 50-mL's behållare och överfördes till centrifugrör som kylades i isbad. Proverna centrifugerades på samma vis som i Försök 1.

I Försök 2A testades effekterna av temperatur försvinnandet av kasein. Hypotesen som testades här var att någon form av adsorption av kasein till vominnehållet förekom. Om temperaturen var låg skulle därför inte kaseinets försvinnande kunna tillskrivas bakteriernas metabolism. Den ena omgången kördes därför vid normal temperatur, medan i den andra omgången kylades vominnehåll och buffertlösning till ca. 2 °C. I 2B testades effekterna av kaseinnivå och donatorko. Försöket utfördes med vominnehåll från två kor varav en låg- och en högutfodrad och med fyra nivåer av kasein per vominnehåll (se Tabell1).

2.3. Analysmetoder

Analys av BLP i Försök 1 i prover från in vitro och in vivo gjordes med bicinchoninic acid- (BCA) metoden enligt Hedqvist and Udén (2006). Värdena för BLP i proverna beräknades med bovint serumalbumin som standard. I Försök 2 analyserades BLP-N som skillnaden mellan total-N och N, som inte kunde fällas med TCA. N-analyserna gjordes med Kjeldahlanalys.

Stärkelse antogs inte vara nedbruten förrän all glukos (fri eller bunden som stärkelse) var fermenterad. Analyserna av in vitro-proverna utfördes enligt Sveinbjörnsson et al. (2006). Torkade och malda in vivo-prover analyserades enligt Åman and Hesselman (1984). Prover togs uter efter amylasbehandlingen och supernatanterna sparades efter centrifugering. Alla frusna supernatanter från stärkelse och BLP in vitro- och in vivo-prov analyserades med hjälp av mid-IRspektroskopi efter titrering till pH 8.3 med 5 M NaOH. Ett Fourier-transforminstrument, normalt använt för rutinanalys av mjölk, utnyttjades (Milcoscan FT120, Foss Tecator AB, Höganäs, Sweden). En separat peristaltisk pump anslöts till kuvetthållaren och ca. 5 mL vätska pumpades in. Dubbla transmissionsspektra för 1055 våglängder mellan 2.0 till 10.75 µm togs ut; medelvärdena konverterades till absorbanser och lagrades sen i Excelformat för vidare bearbetning.

Co från vätskemarkören analyserades i in vivo-proverna med hjälp av en atomabsorbtionsspektrofotometer.

2.4. Beräkningar och statistisk analys

Data från BLP-nedbrytning in vivo var inte användbara för meningsfulla beräkningar. Alla övriga analysvärden blankkorrigerades före databearbetning. Försök gjordes att använda data från individuella perioder, men detta resulterade i ett antal icke trovärdiga lösningar. I stället användes samtliga data från alla perioder samtidigt.

För beräkning av stärkelsenedbrytningen in vivo (Försök 1) och BLP's nedbrytning in vitro (Försök 1 och 2), anpassades en exponetialfunktion (1) till data på återfunnet substrat vid respektive provtagningstid:

$$Y=a*\text{Exp}(-T*b) \quad (1),$$

Där 'T' = tid (h) och 'Y' anger andel kvarvarande BLP in vitro eller den normaliserade stärkelsekoncentrationen i torkat vomunnehåll in vivo. Enligt det ursprungliga antagandet skulle stärkelsekoncentrationerna relateras till koncentrationen av vätskemarkören (CoEDTA). Detta förfarande gav dock orimliga värden och övergavs därför. Normalisering av värdena gjordes för att kunna använda samtliga perioder i samma dataanalys och tillgick så att varje värde dividerades med summan av all observationer inom respektive period. Parameter 'b' anger nedbrytningshastigheten (/h) och medelfermentationstiden (MFT) beräknades som 1/b (h).

Till data för reststärkelse in vitro fordrades en sigmoid fuktion (2) för att uppnå acceptabla anpassningar:

$$Y=a+b/(1+\text{Exp}(-(T-c)/d)) \quad (2)$$

Här betecknar 'Y' andelen reststärkelse. Parameter 'a' motsvarar asymptotiskt värde för $Y \rightarrow \infty$ och Y-interceptet (T_0) = $a+b/(1+\text{Exp}(c/d))$. Medelfermentationstiden beräknades som:

$$\text{MFT} = [\text{kurvas yta} - 1000*a] / [b/(1+\text{Exp}(c/d))] \quad (3)$$

Kurvans yta beräknades som $\int(Y)dT$ för $0 < T < 1000$.

Programmet TableCurve™ 2D v3 (Jandel Scientific, 65 Koch Rd., Corte Madera, CA 94925, USA) användes för kurvanpassningar.

Kalibreringsekvationer upprättades mellan totalglukos från stärkelseanalyserna och erhållna absorbanter från midIR-spektra med s.k. stegvis regression (Minitab v. 14, Minitab Inc., State College, PA, USA). Enbart spektra och glukoskoncentrationer (g glukos/mL) från in vitro-analyserna användes för kalibrering. Totalt 198 prover ingick i kalibreringen med absorbanter från 153 våglängder i området 6.3 till 10.0 μm . Inga försök gjordes att kalibrera IR-spektra mot BLP-koncentrationerna pga allt för låga värden uppmätta med BCA-analysen. I Försök 2B upprättades på samma vis en kalibreringsregression mellan uppmätta BLP-värden (56) och absorbanter in våglängdsområdet 6.2 till 10.0 μm (160).

3. Resultat

3.1 Försök 1

3.1.1. Stärkelse

Stärkelsens försvinnande in vitro och in vivo visas i Fig. 1 och 2. För båda metoderna visade PS den långsammaste (högst MFT) och PSG den snabbaste nedbrytningen. En skillnad mellan in vitro- och in vivo-kurvorna var f.a. att de förra uppvisade en viss lagfas, speciellt vad gäller PS och MS. Skattningar av nedbrytningskurvornas parametrar och beräknade medelfermentationstider visas i Tabell 2 och 3. En jämförelse (regression) mellan mätmetoderna vad gäller MFT gav relativt god överensstämmelse $\text{MFT}_{\text{in vitro}} = \text{MFT}_{\text{in vivo}} * 0.544 + 2.93$ ($R^2=0.93$) även om lutningskoefficienten var låg.

3.1.2. Buffertlösligt protein

Nedbrytningsprofilerna in vivo visade orimliga värden. I vissa fall ökade t.o.m. koncentration Skattningarna av parametrarna i ekvationen (1) för nedbrytningen in vitro visas i Tabell 4. Kurvanpassingarna gav låga R^2 -värden men RK-proteinet bröts ner betydligt långsammare än f.a. kasein.

3.1.4 Analys av reststärkelse med mid-IR

För kalibreringen av reststärkelse i de 198 in vitro-proverna (uttryckt som glukos g/L lösning i provet) utnyttjades 5 våglängder i intervallet 8.498 till 10.008 μm . Anpassning var mycket god, vilket framgår av Fig. 3 och de statistiska måtten i Tabell 5. Skattningen av reststärkelse i de torkade vomproverna var mindre god (Fig. 4).

3.2. Försök 2

I Försök 2A återfanns 99% av kaseinet omdelbart efter dosering (ca. 3 min) när temperaturen hölls nära 2°C och fluktuerade under övriga tider mellan 69 och 81% av tillförd mängd. Vid normal vomtemperatur (39°C) återfanns inte mer än 52% efter pulsdos, som därefter minskade i takt med mikrobernas nedbrytning av kaseinet.

I Försök 2B visas nedbrytningsprofilerna för total mängden buffertlösligt protein-N och ammoniakhaltens förändring med tiden i Fig. 5 med vom innehåll från en sinko (L) och en mjölkande ko (H). Amoniakhalten ökade för samtliga behandlingar med kasein, men skillnaderna var bara marginella mellan de två högsta doserna och mellan kor.

Andelen kasein-N som återfinns vid tiden 0 ökade med ökande kaseindos medan mängden, som försvunnit ur lösningen, var relativt konstant med ett medelvärde på 480 mg N/kg vom innehåll (SD = 44). En regression av återfunnet kasein-N vid tiden 0 i förhållande till dosens storlek avslöjade ett marginalutbyt på 94%.

Kurvanpassning med Ekv. 2 gav i stort sett samma värden för de två korna, men lägre nedbrytningshastighet med ökad kaseindos uttryckt som mg N/kg vom innehåll (Fig. 6).

En skattning med mid-IR-sepkroskopi av den totala koncentrationen av BLP-N i de färska proverna visas i Fig. 7 och Tabell 6. Anpassningen var inte helt tillfredsställande, vilket kanske kan förklaras av varierande andelar av små peptider i proverna. Dessa borde ge liknade absorptionspektra som de proteiner som analyserats genom fällning med TCA.

4. Diskussion

4.1. Försök 1

Försökets syfte vad gäller stärkelse och BLP var att testa om in vitro-mätningar kan vara jämförbara med in vivo.

Stärkelsekällorna som användes i detta försök var därför inte valda för att representera typiska fodermedel utan för att de förhoppningsvis skulle skilja sig åt beträffande nedbrytningshastighet och samtidigt inte innehålla lösliga proteiner eller vara påverkade av finmalningsgrad, mm. Stärkelsenkällornas nedbrytning, uttryckt som nedbrytningshastighet (/h) eller som MFT (h) varierade både in vitro och in vivo men ranking var identisk för de båda metoderna (Tabell 2 och 3). Den ursprungliga planen att förhindra allt utflöde av stärkelse (och BLP) med en plugg i nätmagens öppning till bladmagen var tekniskt svår att genomföra och övergavs. I stället användes en vätskemarkör för att korrigera utflödet. Korrigering av stärkelseutflödet med flödet av vätskemarkören visade sig dock i vissa fall ge ökande stärkelsekoncentrationer och därför användes de okorrigerade värdena istället. För att inte utsätta korna för onödig stress undanhölls inte foder mer 11 timmar under dagen.

Följaktligen gjordes inga provtagningar i vommen under längre tid än 6 timmar. Den korta provtagningstiden förorsakade ytterligare en osäkerhet i skattningen av parametrarna i ekvationen (1) för stärkelsenedbrytningen genom att bara högst 50% av den totala stärkelsen hade brutits ner efter denna tid. Man kan nog konstatera att in vitro-metoden ger ett rimligt svar gentemot vad som sker i vommen även om det finns anledning till ytterligare innovationer vad gäller in vivo-metodiken. Den metod som presenterats här har inte tidigare beskrivits i litteraturen. Den överväldigande majoriteten av de värden på stärkelsenedbrytning som redovisas i litteraturen kommer från den s.k påsmetoden. Ett stort problem med dessa är att upp till 80% av invägd stärkelse förloras enbart med tvättning av påsarna (Offner et al., 2003).

Mätningarna av BLP-nedbrytningen in vitro och in vivo visade sig inte fungera tillfredsställande. Detta konstaterades också av Hedqvist och Udén (2006), men inga specificerade orsaker presenterades närmare. Mätningarna in vivo gav inga användbara data och dessutom var det initiala försvinnandet in vitro var så stort att mätningarna blev osäkra. Dessa negativa resultat gav dock anledning till en uppföljning av anledningarna till de stora initiala förlusterna in vitro (Försök 2).

4.2. Försök 2

Resultaten från jämförelsen av temperaturens inverkan på koncentrationen av kasein i lösning direkt efter dosering visade att en låg temperatur effektivt motverkar förlusterna. Anledningar till detta är svårt att förklara. Beräkningar av Hedqvist och Udén (2006), som baserats på uppgifter från Wallace (1985), visade att uppskattningsvis 6% av kaseinkvävet borde ha bundits till bakterier i det (mikro-) in vitro-system, som användes i Försök 1 och i Försök 2A, borde också mindre än 10% av kvävet adsorberats till bakterier. Detta skulle, enligt Wallace (1985), också gälla vid den låga temperaturen.

I det sista delförsöket visades att ca. 488 mg kasein-N/kg försvann ur lösning per kg vom innehåll initialt. Detta förklarar med all tydlighet de tidigare problemen med mätningar av BLP av Hedqvist och Udén (2006) och i Försök 1. I Försök 1 var doserna 200 mg N/L vomvätska in vitro och maximalt ca. 300 mg N/kg vom innehåll in vivo. Det finns anledning att förmoda att kasein inte bara binder till bakterier och protozoer utan även till partiklar i vommen och att detta kan vara temperaturberoende. Andra proteiner kan möjligen bindas i mindre utsträckning och detta skall utforskas i kommande försök. Kaseindosens

storlek hade också en tydlig effekt på nedbrytningshastigheten, som minskade med ökad dos. Detta kan eventuellt förklaras med principer för substratmättnad (Michaelis-Menten-kinetik). Emellertid, borde då en linjär del ha observerats vid den högsta dosen i början under substratmättnadsfasen för att därefter övergå i en kuvilinjär del. Något sådant kunde inte observeras utan plus- och minus-residualerna från anpassningen av exponentialfunktionen alternerade över tiden.

4.3. Kalibrering av mid-IR-instrumentet

Kalibreringen av reststärkelse fungerade mycket tillfredsällande in vitro med enbart utnyttjande av 5 våglängder (Tabell 5; Fig. 3). Standardavvikelsen på 0.089 motsvarar en variationskoefficient på ca. 6%, vilket torde var mer än tillfredsällande för mätning av stärkelsens nedbrytningshastighet och inte enbart är förorsakat av mid-IR-metoden utan även av fel i referensmetoden. Kvoten 12.8 mellan materialets standardavvikelse och standardavvikelsen från regressionen uppfyller med råge kravet på att vara större än 3, som ofta åberopas i litteraturen. Kostnadsbesparingar med mid-IR-analys, jämfört med enzymatisk analys ligger uppskattningsvis på ca. 43%. En sämre kalibrering erhålls med data från in vivo-försöket med stärkelse (Fig. 4). Möjliga anledningar kan vara problem med den enzymatiska metoden där möjligen amyloset även kan lösliggöra andra kolhydrater än glukos från fiber som fanns i vommen, som därmed skulle kunna bidra till IR-spektrat men inte påverka resultatet från den enzymatiska bestämningen. Kalibreringen av BLP i Försök 2A med kasein gav förhoppningar om mid-IR kan användas för mätning av BLP. Tre problem kan urskiljas med denna kalibrering. Det första rör möjligheten att peptider, som inte fälls med TCA och därmed inte påverkar BLP-värdet, absorberar och därmed bidrar till absorbansen i viktiga våglängdsområden. Det andra problemet rör absorbansmaxima för de flyktiga fettsyror som sammanfaller med kaseinet vid ca. 6.46 μm . Det tredje gäller materialets spridning (standardavvikelse), som var för litet med för många låga värden och för få höga.

Samanfattningsvis har detta projekt visat att stärkelsenedbrytning in vitro ger liknande resultat som mätningar i vommen och kan, till skillnad från påsmetoden, mäta försvinnandet hos all stärkelse i provet. En viktig pusselbit till en korrekt mätning av BLP's nedbrytning gjordes i och med att kaseinets relativt konstanta bindning till den fasta fasen kunde klarläggas. Ytterligare arbete fordras dock för att kunna förklara fenomenet med minskad nedbrytningshastighet med ökad proteindos. Lösliga proteiner kan överhuvud taget inte mätas med påsmetoden. Metoden att mäta reststärkelse med mid-IR-metoden fungerade mycket bra för skattning av reststärkelse in vitro och kan reducera analyskostnaderna. Lovande resultat erhöles även på ett begränsat material med mätning av restproteiner in vitro.

Referenser

- Hedqvist, H. och Udén, P., 2006.
Offner, A, Bach, A, Sauvart, D., 2003. Anim. Feed Sci. Technol. 106, 81–93
Sveinbjörnsson, J., Murphy, M,L, and Udén, P., 2007. Anim. Feed Sci. Technol. 132, 171–185.
Udén, P., Colucci, P.E. and Van Soest, P.J., 1980. J. Sci. Food Agric. 1:625-632.
Åman, P. och Hesselman, K., 1984. Swedish J. Agr. Res. 14, 135-139.

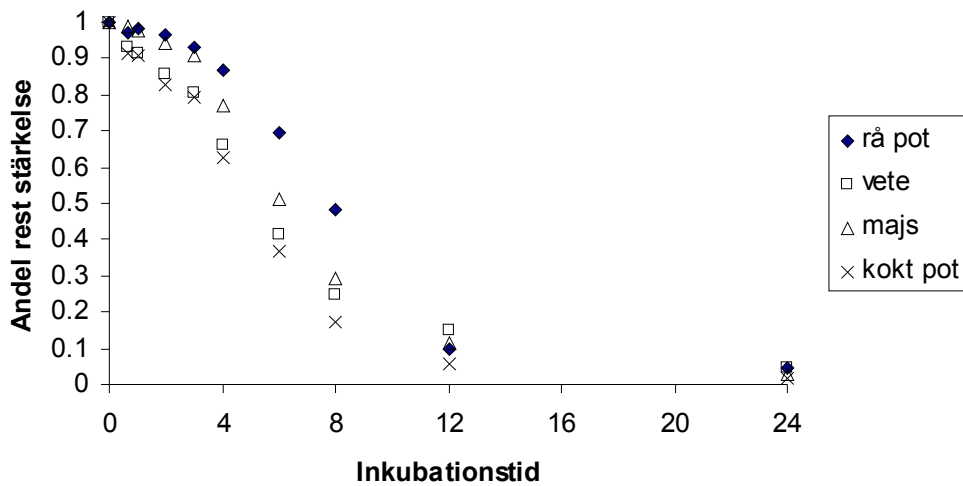


Fig. 1. Andel reststärkelse efter inkubation in vitro (periodmedelvärden).

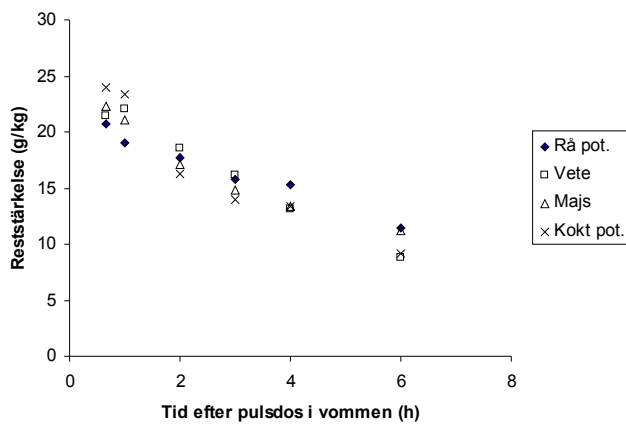


Fig 2 Reststärkelse i vomminnehåll hos kor efter pulsdos (periodmedelvärden).

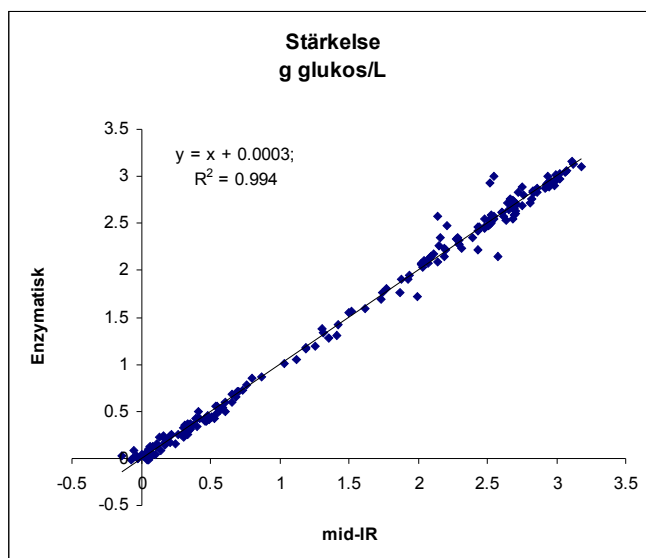


Fig. 3. In vitro-inkubationer: skattad (mid-IR) och analyserad (Enzymatisk) reststärkelse

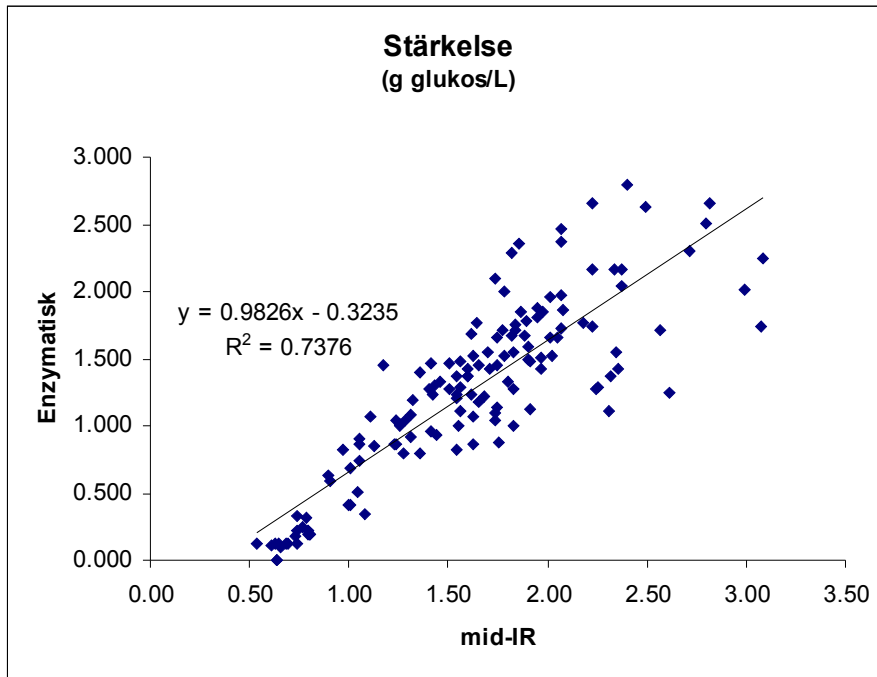


Fig. 4. In vivo-inkubationer: skattad (mid-IR) och analyserad (Enzymatisk) reststärkelse

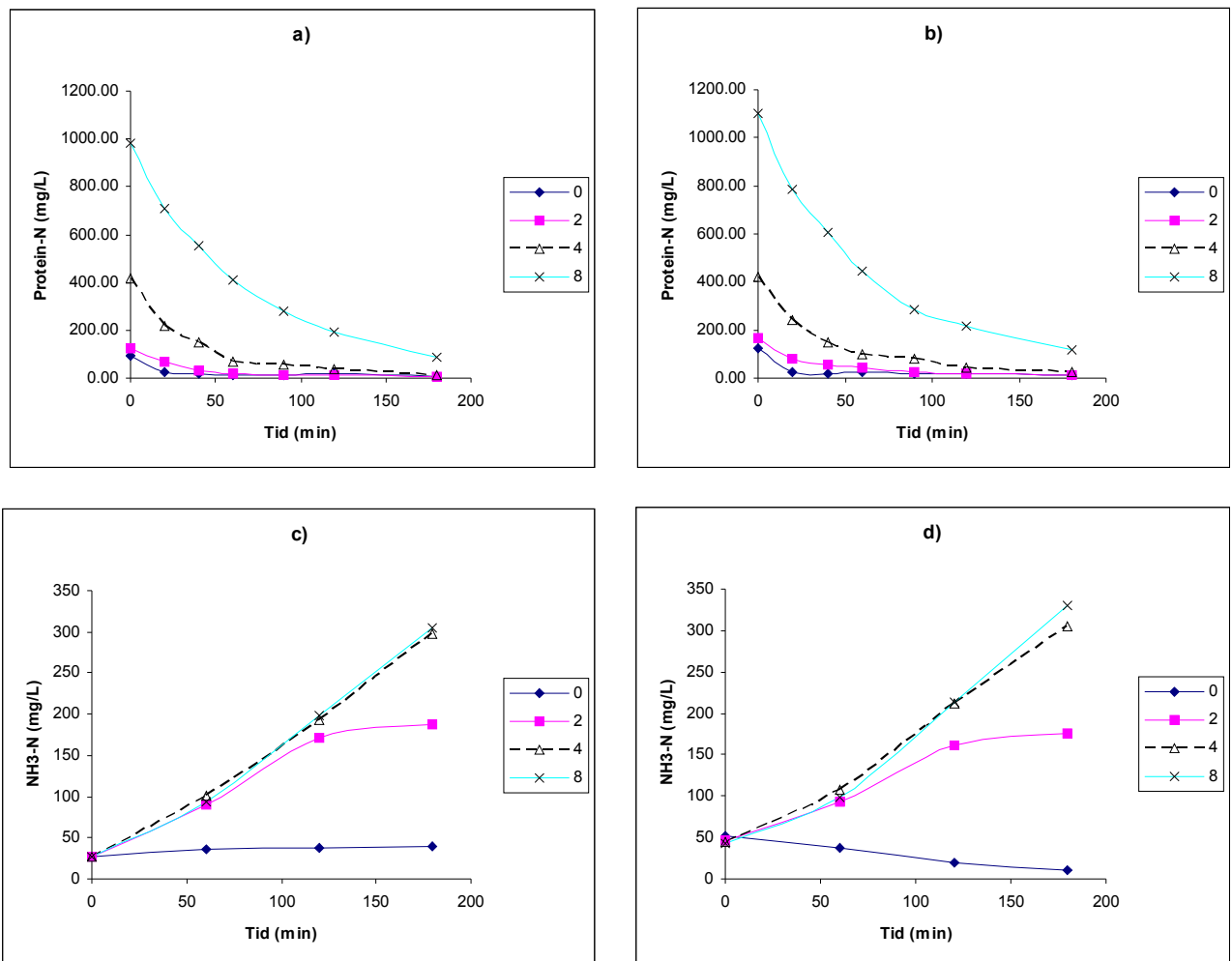


Fig. 5. Makro in vitro: lösligt protein- och NH₃-N i vominnehall från Ko L (a, c) och H (b, d).

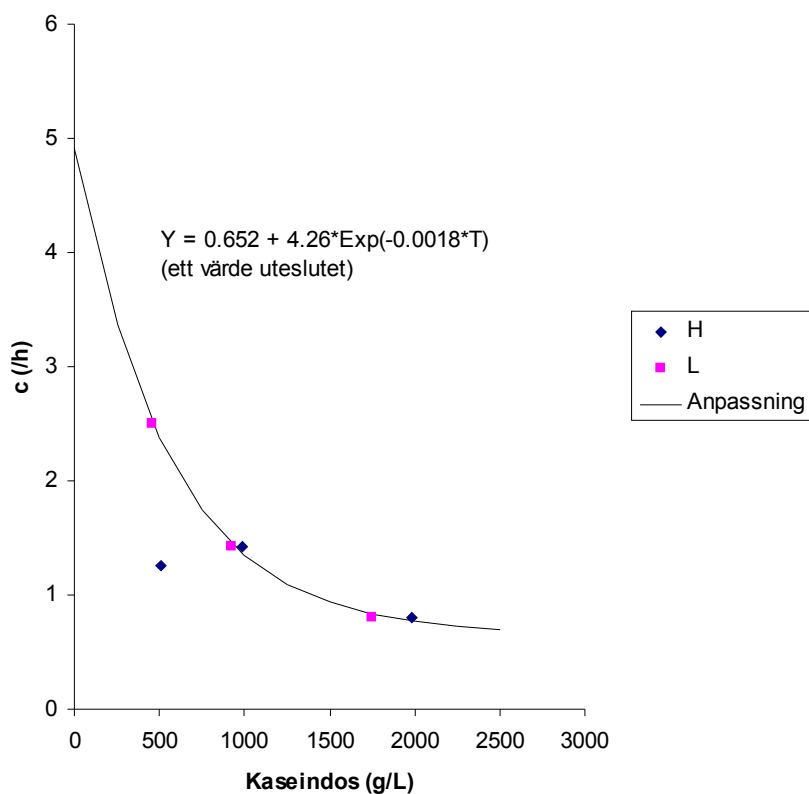
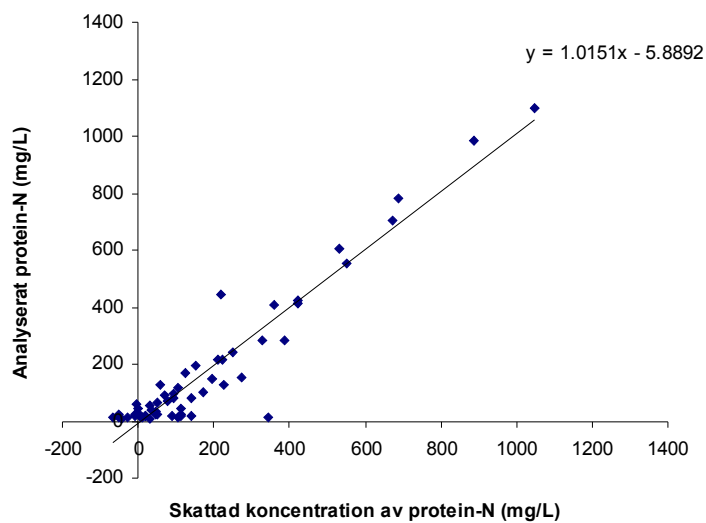


Fig. 6. Försök 2B: Effekten av dos kasein på kaseinets skattade nedbrytningshastighet (c) med användande av vom innehåll från två kor låg (L) och hög (H) utfodringsnivå.



Figur 7. Försök 2B: skattad (mid-IR) och analyserad koncentration av buffertlösligt protein

Tabell 1. Specifikationer av Försök 2 (A och B)

	A	B
Antal rör	2 x 2	8
Temp. (°C)	39/2	39
Vominnehåll (kg)	5	6
Donatorko ^a	L	L/H
Buffert (L)	3	4
Kasein (g)	0/7.25	0/4.6/9.1/18.2
Provtider (antal; 0 – 3 h)	4	7

^aL = lågutfodrad sinko; H = högutfodrad mjölkande ko.

Tabell 2. In vitro: parametervärden och medelfermentationstid för de olika stärkelse typerna

Stärkelsekälla	Parameter värden ^a				R2	MFT ^b
	a	b	c	d		
Rå potatis	0.01	0.99	7.97	-1.95	0.908	8.1
Majs	0.03	1.00	6.92	-1.96	0.916	7.2
Vete	0.03	1.01	5.70	-2.23	0.901	6.3
Kokt potatis	0.02	1.00	5.00	-1.83	0.984	5.4

^a $Y=a+b/(1+\exp(-(x-c)/d))$; ^bMFT=medelfermentationstid

Tabell 3. In vivo: parametervärden och medelfermentationstid för de olika stärkelse typerna

	Parametervärden			
	a	b	R2	MFT
		(/h)		(h)
Kasein	0.54	2.19	0.70	0.46
Dranksirap	0.80	0.76	0.70	1.31
Lupin	0.99	0.88	0.84	1.14
Rapskaka	0.60	0.48	0.57	2.09

^a $Y=a*\exp(-b*X)$; ^bMFT=medelfermentationstid

Tabell 4. In vitro: parametervärden och medelfermentationstid för de olika proteintyperna

	Parametervärden			
	a	b	R2	MFT
		(/h)		(h)
Kasein	0.54	2.19	0.70	0.46
Dranksirap	0.80	0.76	0.70	1.31
Lupin	0.99	0.88	0.84	1.14
Rapskaka	0.60	0.48	0.57	2.09

^a $Y=a*\exp(-b*X)$; ^bMFT=medelfermentationstid; ^cPeriod 3 utesluten

Tabell 5. Försök 1: Regressionskoefficienter och kalibreringsnoggrannhet från mid-IR-analys av reststärkelse (g/L lösning) i in vitro-prover (n = 198)

Våglängd (µm)	Koefficient ^a	Värde	S ^b	R2	R2(pred.)	SD/S ^c
	a	0.6335				
8.498	b1	-239.1				
8.669	b2	268.9				
8.816	b3	-43.2				
9.159	b4	-28.9				
10.008	b5	29.9	0.089	99.4	99.35	12.78

^a $Y=a + b1*Abs1 + b2*Abs2 \dots$; ^bS = standardavvikelse för regressjonen; ^cSD = provmaterialets standardavvikelse

Tabell 6. Försök 2B: Regressionskoefficienter och s kalibreringsnoggrannhet från mid-IR-analys av lösligt protein (mg/L lösning) i makro-in vitro-prover (n = 56)

Våglängd (µm)	Koefficient ^a	Värde	S ^b	R2	R2	SD/S ^c
					(pred.)	
	a	434				
6.201	b1	217				
6.261	b2	-3389				
7.261	b3	-11408				
8.025	b4	-380621				
8.075	b5	504359				
8.640	b6	-51256	88.2	87.67	84.9	2.8

^a $Y=a + b1*Abs1 + b2*Abs2 \dots$; ^bS = standardavvikelse för regressjonen; ^cSD = provmaterialets standardavvikelse