

SLF-projekt H0630380: In vitro-metod för osmältbar Neutral Detergent Fiber (iNDF) Slutrapport

Bakgrund

Den största delen av de analyser som görs i Sverige av gårdsproducerade foder gäller vallfoder, där värdet för omsättbar energi är det främsta uttrycket för fodrets kvalitet. I Sverige används sedan 1979 våmvätskelöslig organisk substans (VOS) enligt Lindgren (1979) som referensmetod för smältbarhetsbestämning av vallfoder och därmed indirekt uppskattning av omsättbar energi.

Från och med 2006 har fodervärderingssystemet NorFor Plan (Gustafsson m fl, 2005) för mjölkkor tagits i drift i Sverige, Norge, Danmark och Island. Systemet är ett samarbete mellan husdjursorganisationerna i dessa länder. Det är en mekanistisk modell där det individuella djurets omsättning av fodret modelleras utifrån analyserade egenskaper hos fodret och resulterar i ett fodervärde uttryckt i bland annat nettoenergi och aminosyraupptag (AAT).

Den foderparameter som enligt känslighetsanalys (Eriksson, 2005) har allra störst betydelse för slutresultatet är andelen osmältbar Neutral Detergent Fiber (iNDF). Referensmetod för bestämning av iNDF är inkubation av foderprovet in sacco i våmfistulerad ko under 288 timmar (NorFor, 2007). Kostnaden för en sådan analys är ca 1500:-. För rutinanalys av iNDF i vallfoder har kalibreringar för Nära Infraröd Reflektans (NIR) utvecklats. Det finns dock stort behov av en in vitro-metod för kvalitetskontroll av NIR-resultaten. För att en NIR-kalibrering skall vara tillförlitlig krävs kontinuerlig uppföljning med referensanalys. Vid NIR-analys av omsättbar energi kalibrerad från VOS har hittills 5% av proven sänts till referensanalys med VOS, liksom alla prov som fallit utanför normalt område, så kallade outliers. Att i samma utsträckning referensanalysera iNDF in sacco på våmfistulerade kor är inte möjligt. För prover från vallsortförsök och liknande som hittills analyserats med VOS-metoden in vitro, är den kalibreringsberoende NIR-metoden olämplig.

Då VOS-värdet till stor del är ett mått på fiberns nedbrytbarhet borde det finnas en stark korrelation mellan VOS och iNDF bestämd in sacco i våmfistulerad ko, vilket också bekräftats vid preliminära jämförelser. I VOS-metoden ingår inte behandling med Neutral Detergent-lösning, utan mikrober från inkubationen ingår i viss mån i vikten. Det är därför rimligt att anta att behandling med Neutral Detergent av VOS-resten skulle förbättra korrelationen. Förutom de uppenbara skillnaderna i inkubationstid och miljöer mellan VOS (96 timmar in vitro) och iNDF (288 timmar in sacco) påverkas resultaten förmodligen också av att olika filterstorlekar av praktiska skäl används vid VOS- respektive NDF-analys. Udén (2006) visade att betydande förluster av partiklar kan ske med de standardfilter som används. Som ett led i utvecklingen av en väl fungerande in vitro-metod för osmältbar NDF är det därför också angeläget att undersöka filtreringstekniken.

Vår vanliga VOS-inkubation pågår i 96 timmar. In vitro-inkubationer enligt de internationellt mest tillämpade metoderna (Tilley & Terry, 1963; Vogel m fl, 1999) begränsas ofta till 48 timmar med våmvätska följt av 48 timmar med pepsinlösning. Så lång inkubationstid som de 288 timmar som används vid iNDF-bestämning in sacco ställer högre krav på tekniken och kräver eventuellt också reinokulation med ny våmvätska efter en tid.

Syfte

1. Att etablera regressioner för beräkning av iNDF direkt från VOS-värdet för gräs- och baljväxtvallfoder
2. Att vidareutveckla in vitro-teknik som rutinmetod för iNDF-bestämning

Material och metoder

Prover för analys

Totalt 112 prover enligt Tabell 1 användes för jämförelse av iNDF- och VOS-värden. Proverna kom från utfodringsförsök och gårdsstudier.

Tabell 1. Prover använda för jämförelse av iNDF- och VOS-värden.

	Medel	Min	Max
Vallprover (75 st)			
NDF, g/kg ts	467	267	625
iNDF, g/kg ts	89	39	252
VOS	83	57	91
Majsensilage (21 st)			
NDF, g/kg ts	407	298	547
iNDF, g/kg ts	83	48	118
VOS	84	75	91
Helsädesensilage (16 st)			
NDF, g/kg ts	510	436	569
iNDF, g/kg ts	131	72	193
VOS	76	69	84

iNDF in sacco

Alla analyser har gjorts vid Kungsängens forskningscentrum. iNDF-analys in sacco gjordes enligt NorFors rekommendationer (NorFor, 2007). I korthet innebär det att proverna torkades i frystork eller torkskåp vid högst 60° C och maldes på knivkvarn med 1.5 mm såll. Proven inkuberades sedan i påsar med 12 µm maskstorlek under 288 h i våmmen hos två sinkor utfodrade på underhållsnivå. Till varje ko användes två påsar om 2 g, alltså totalt fyra påsar/prov. Efter avslutad inkubation sköljdes påsarna i tvättmaskin, torkades och vägdes. Inkubationsresten i de två påsarna från varje ko slogs ihop för NDF-analys i värmeskåp (Chai & Udén, 1998) med tillsats av amylas och natriumsulfit (Mertens, 2002). För att undersöka repeterbarheten upprepades iNDF-bestämningen in sacco efter 1-2 år så att 15 av proven analyserades två gånger och 5 prov tre gånger.

Generellt in vitro-inkubationer

Alla inkubationer gjordes i duplikat och medelvärden från de båda rören användes i för regressionerna, medan värden från enskilda rör användes vid beräkningar av behandlingseffekter på restmängder. I hanteringen eftersträvades samma anaerobstandard som i den rutinmässiga VOS-analysen.

Standard VOS

VOS-analys gjordes enligt gängse rutin vid Kungsängens forskningscentrum (Lindgren, 1979) på delprover malda på hammarkvarn med 1 mm såll. 500 mg prov vägdes in i duplikat i glasfilterrör med porstorlek 1 (100-160 µm). Våmvätska från en sinko utfodrad på

underhållsnivå silades genom ett nät under gasning med koldioxid och blandades med VOS-buffert i proportionerna 1 del våmvätska:49 delar buffert på volymsbasis. Till varje rör sattes 50 ml av blandningen och proven inkuberades under 96 h i vattenbad vid 39° C. Vid inkubationsbrytningen sögs vätskan bort genom glasfiltret och provet sköljdes tre gånger med avjonat vatten och tre gånger med aceton, torkades vid 103 C över natten och askades. Mängden onedbruten organisk substans beräknades som viktskillnaden mellan torkning och askning.

Förlängda inkubationer organisk substans-rest

Inkubationer med tidsintervallen 96, 192 och 288 h gjordes på samma sätt som den standardiserade VOS-analysen men i glasfilterrör med porstorlek 2 (40-100 µm). För bestämning av onedbruten organisk substans behandlades proven vid inkubationsbrytningen som beskrivits ovan.

Förlängda inkubationer NDF-rest

Delprov för bestämning av NDF-rest inkuberades som ovan med tidsintervallen 96, 192 och 288 h i glasfilterrör med porstorlek 2 (40-100 µm). Vid inkubationsbrytningen sköljdes proven enbart med avjonat vatten Sedan sattes 50 ml ND-lösning till röret och det placerades i värmeskåp för analys av NDF (Chai & Udén, 1998,; Mertens, 2002).

Förlängda inkubationer pappersfiltrering organisk substans-rest

Avsikten med detta delexperiment var undersöka om den vanliga filtreringen genom glasfilter ger upphov till betydande förluster av små partiklar och därmed felaktigt hög nedbrytbarhet. Proven inkuberades proven i 175 ml Kjeldahlrör som ovan med tidsintervallen 96, 192 och 288 h. Samma proportioner prov/våmvätska/buffert som tidigare behölls men mängderna skalades upp till 750 mg prov och 75 ml våmvätska/buffert. Vid inkubationsbrytningen användes en specialkonstruerad filtertratt (Udén, 2006) med 6 µm pappersfilter och diameter 110 mm. Samma sköljrutiner med avjonat vatten och aceton som i VOS-analys var avsedda att användas, men det visade sig omöjligt att filtrera proven genom pappersfiltren. Det gick därför inte att göra någon jämförelse med filtrering genom glasfilter när det gäller försvinnande av organisk substans.

Förlängda inkubationer pappersfiltrering NDF-rest

Dessa prov inkuberades på samma sätt i Kjeldahlrör med 750 mg prov och 75 ml våmvätska/buffert under 96, 192 och 288 h. Vid inkubationsbrytningen behölls vätska och prov i röret och 75 ml sval ND-lösning fylldes på. Röret placerades sedan i värmeskåp i 85° C under 20 timmar. Därefter tillsattes amylas och natriumsulfit och provet lämnades i värmeskåp ytterligare 1.5-2 timmar. Proven filtrerades genom torkade och taravägda 6 µm pappersfilter (Udén, 2006) och sköljdes med avjonat vatten och aceton. Pappren lades i taravägda deglar, torkades (103° C) och askades (500° C) enligt rutin för NDF-bestämning.

Förlängda inkubationer reinokulering

Delexperimentet gjordes för att undersöka eventuell effekt av att i en 288 timmars inkubation tillsätta ny våmvätska efter 96 timmar. Glasfilterrör med porstorlek P2 användes. Fyra olika behandlingar enligt Tabell 2 ingick. Vid inkubationsbrytningen behandlades proven som under "Förlängda inkubationer NDF-rest".

Tabell 2. Delexperiment med reinokulation 288 h

Behandling	Vid start	Tillsats efter 96 timmar	Syfte
A	44 ml buffert + 1 ml våmvätska	4 ml VOS-buffert + 1 ml våmvätska	Reinokulationseffekt
B	44 ml buffert + 1 ml våmvätska	5 ml VOS-buffert	Anaerobkänslighet röröppning
C	48 ml buffert + 2 ml våmvätska	-	Våmvätskemängdeffekt
D	49 ml buffert + 1 ml våmvätska	-	Kontroll, standardprocedur för VOS

Beräkningar och statistisk bearbetning

VOS-resultat och iNDF-resultat har av konvention tidigare uttryckts i icke jämförbara enheter, VOS som försvinnande av organisk substans och iNDF som restandel av torrsbstans eller av totalt NDF-innehåll. Alla analysresultat i denna rapport är redovisade som g restmängd/kg invägd organisk substans och regressionerna är gjorda på den basen. SAS 9.1 har använts för bearbetning av resultaten. Regressionerna gjordes med procedurerna GLM och REG. In vitro-metoderna var oberoende (x) variabel och iNDF in sacco var beroende (y) variabel. För att identifiera enskilda observationer med stor påverkan på regressionen användes Cook's distance i Procedure REG. Residualerna från regressionerna (predikerat från in vitro minus observerat in sacco) plottades mot predikerat värde (St-Pierre, 2003). Variansanalys av olika in vitro-behandlingar gjordes med Procedure MIXED. Repeterbarhet för in sacco-metoden undersöktes med Procedure VARCOMP.

Resultat

Figur 1 visar regressionerna för iNDF in sacco mot VOS-rest och Figur 2 visar prediktionsfelen (residualerna) för samtliga prover. Vallprovet med högst iNDF-värde klassades som en outlier och ströks ur regressionsunderlaget då det hade stor inverkan på regressionslinjen. Vall, majs och helsäd hade skilda regressionslinjer ($p < 0.0001$) och intercept ($p < 0.05$) medan gräs och vallbaljväxter inte var skilda åt ($p > 0.2$). För beräkning av iNDF direkt från VOS-värdet motsvarar regressionerna i Figur 1:

Vallfoder: $iNDF, g/kg OM = 546 - 5.40 \times VOS$

Majsensilage: $iNDF, g/kg OM = 421 - 3.96 \times VOS$

Helsäd: $iNDF, g/kg OM = 754 - 8.04 \times VOS$

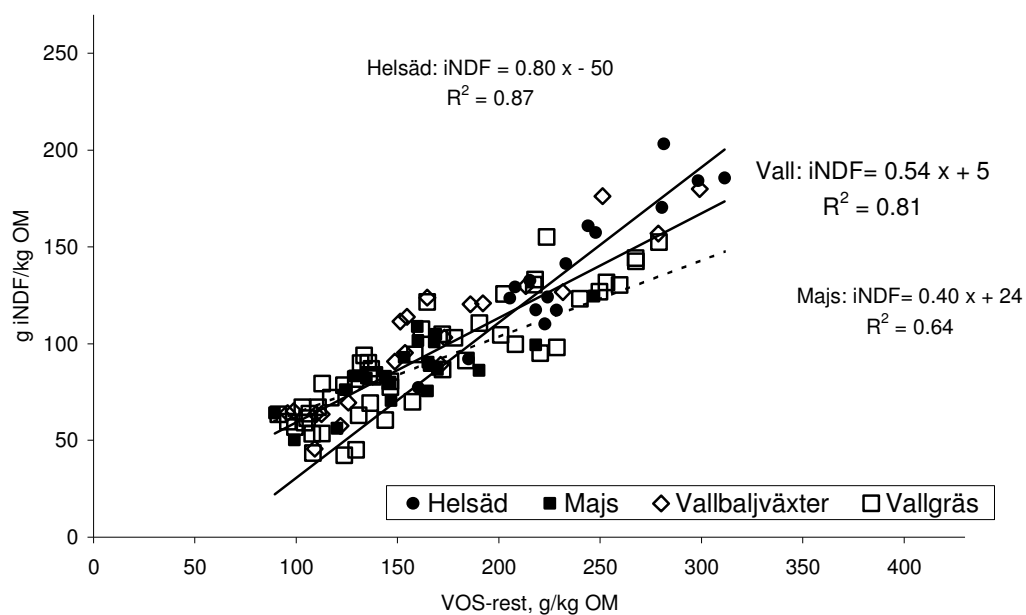
Behandling med ND-lösning efter en 96 h VOS-inkubation av vallprover (Figur 3) ledde främst till en nivåförskjutning och minskade inte variationen. Däremot minskade standardavvikelsen mellan duplikat och var 5 g/kg invägd organisk substans för alla inkubationstider med ND-behandling mot 7 g för VOS-analys och 10 g för övriga inkubationer.

Fördubbling av inkubationstiden in vitro till 192 h minskade restmängden ($p < 0.05$), både av total organisk substans och av NDF (Figur 4). En ytterligare förlängning till 288 h ledde till en liten, icke-signifikant minskning av restmängden, men iNDF-värdet från in sacco-bestämning var fortfarande avsevärt lägre. Regressioner av iNDF-värden mot in vitroresultaten (Tabell 3) visade på förändringar i både intercept och lutning med ungefär lika stor påverkan när inkubationstiden förlängdes. Behandling med ND-lösning avlägsnade i medeltal 38 g/kg

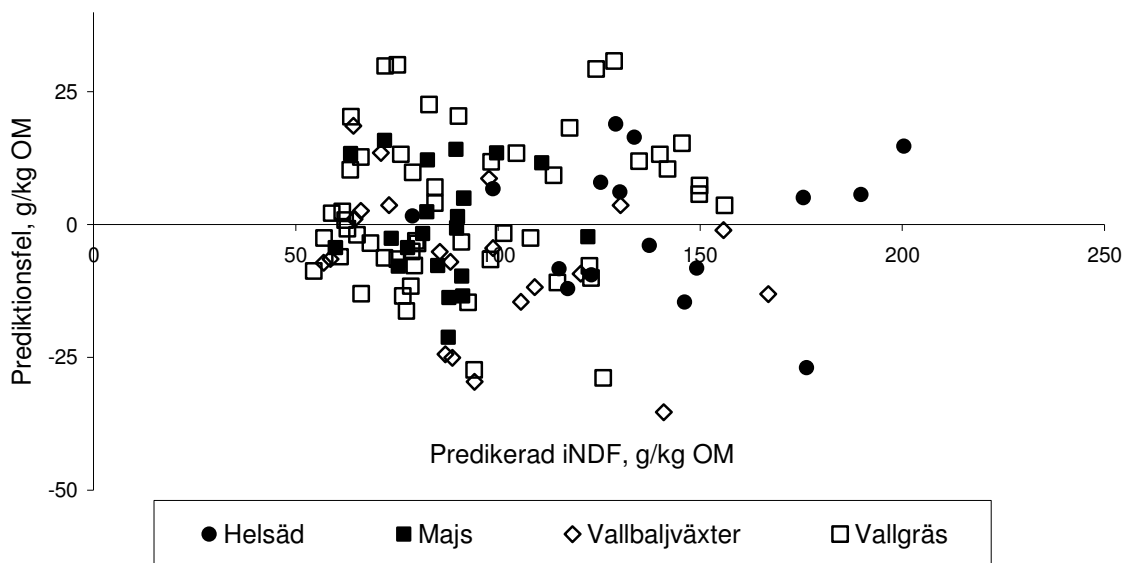
invägd organisk substans från inkubationsresterna men ledde även vid de långa inkubationstiderna till en ökad variation i regressionen i form av ett större standardfel.

De långa inkubationstiderna fungerade tekniskt bra. Måttlig mögeltillväxt, upp till ca 1cm² av ytan förekom i 25-50% av rören vid tiderna 192 och 288 h mot ca 25% av rören vid 96 h inkubation. Reinokulation med ny våmvätska under pågående inkubation ledde i det aktuella delförsöket inte till ökad nedbrytning utan till en större restmängd, medan övriga behandlingar var likvärdiga (Figur 5). Filtrering på 6 µm pappersfilter gav vid alla inkubationstider en större mängd NDF-rest än det glasfilter (P2) som rutinemässigt används vid NDF-analys (Figur 6). Skillnaden motsvarade 24-31 g/invägd organisk substans.

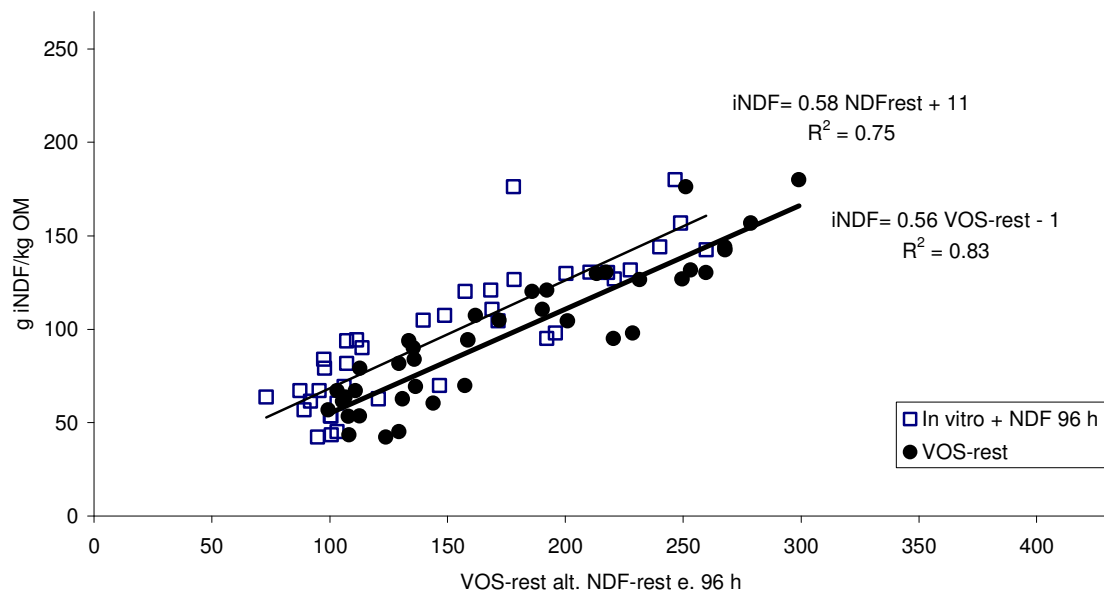
Variationskoefficienten mellan upprepningar (repererbarhet) av iNDF-bestämningar in sacco var 8% och variationskoefficienten mellan kor var 2%.



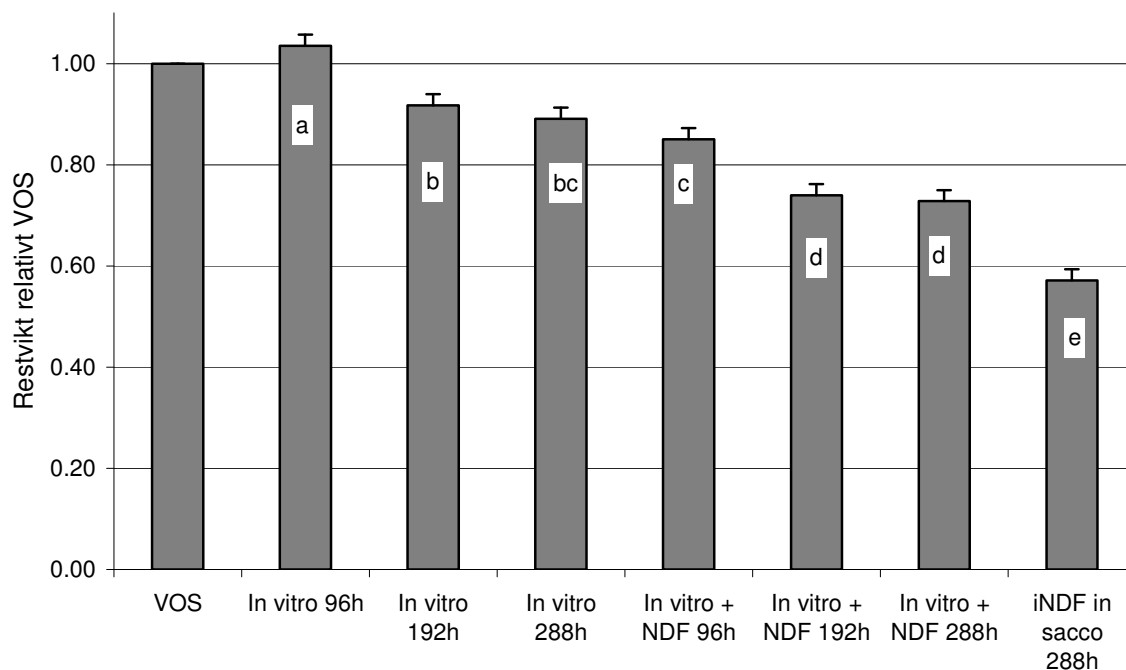
Figur 1. Regressionslinjer iNDF in sacco mot VOS-rest. Standardfel för regressionerna: hetsäd 13 g, vall 15 g, majs 11 g.



Figur 2. Prediktionsfel (residualer) för regressionerna i Figur 1.



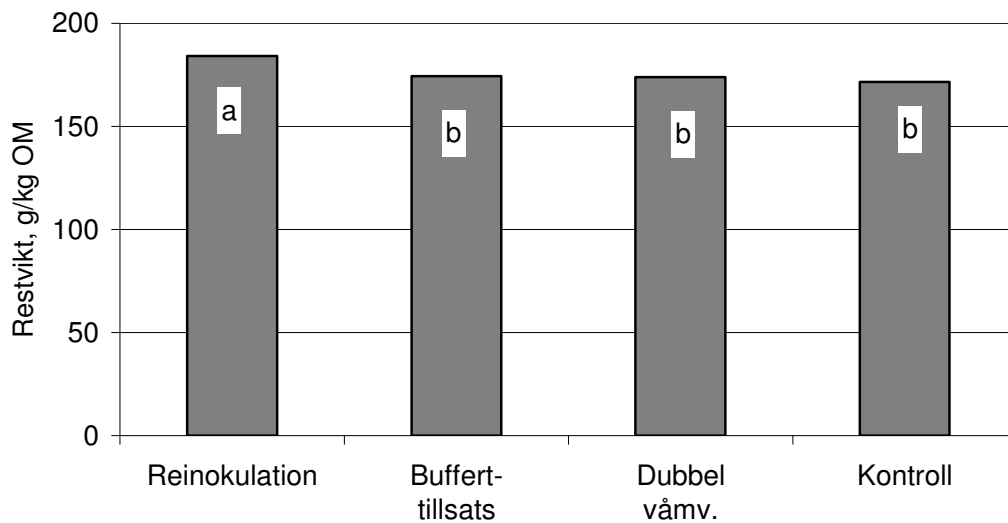
Figur 3. Regressionslinjer iNDF in sacco mot VOS-rest och mot NDF-rest efter 96 h in vitroinkubation av 39 st vallprover. Standardfel för VOS-rest 15 g, för NDF-rest 19 g (16 g om observationen med störst residual stryks).



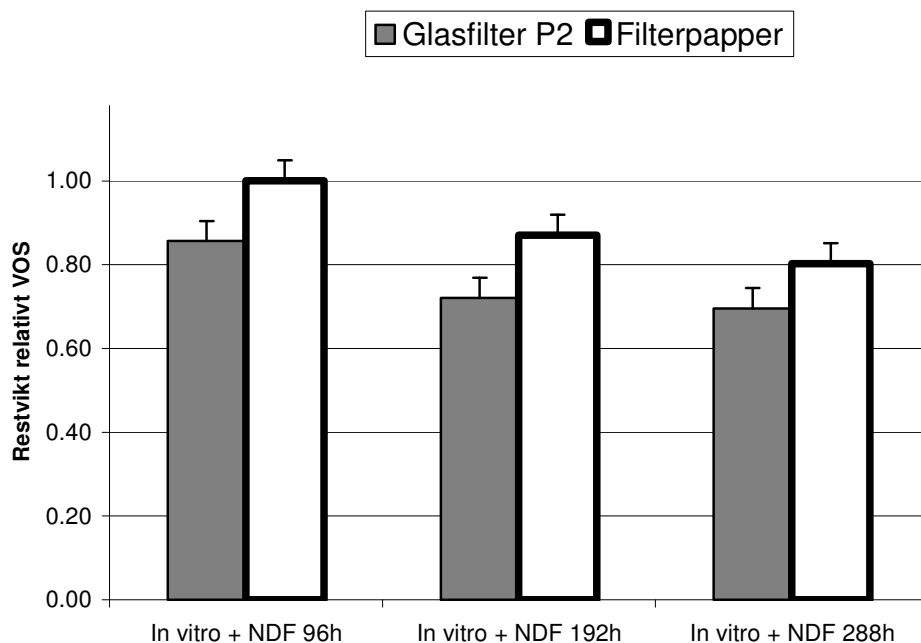
Figur 4. Restvikt (askfri) relativt VOS-rest för inkubationer in vitro med och utan ND-behandling samt för iNDF in sacco. VOS enligt standardmetod filtrerad på glasfilter P1 (100-160 μm), alla övriga behandlingar filtrerade på glasfilter P2 (40-100 μm). Staplar anger standard error of difference. Värden utan gemensam bokstav är signifikant skilda ($p < 0.05$ för Bonferronitest). 10 vallprover.

Tabell 3. Regressioner för iNDF in sacco (g/kg OM) mot inkubationsrest in vitro. 9 vallprover

	VOS	In vitro 96h	In vitro 192h	In vitro 288h	In vitro + NDF 96h	In vitro + NDF 192h	In vitro + NDF 288h
Intercept	-12	-15	-8	-3	-2	8	11
Lutning	0.63	0.63	0.67	0.65	0.69	0.70	0.69
R ²	0.89	0.89	0.91	0.88	0.76	0.81	0.79
Standardfel	18	18	16	19	27	23	25



Figur 5. NDF-rest efter reinokulation med ny våmvätska under pågående inkubation in vitro. Total inkubationstid 288 h med extra tillsats av våmvätska (reinokulation) eller buffert efter 96 h, alternativt dubbel våmvätskemängd vid inkubationsstart. Kontrollen inkuberad under 288 h med våmvätska och buffert i gängse VOS-proportioner. Medelvärdet för reinokulation skilt ($p < 0.05$) från övriga behandlingar. 5 vallprover.



Figur 6. Restvikt (askfri) relativt VOS-rest för vallprover som inkuberats in vitro och behandlats med ND-lösning. Proven filtrerade på glasfilter P2 (40-100 μm) och på pappersfilter 6 μm . Staplar anger standard error of difference. Filtertyperna skilda ($p < 0.05$) vid alla inkubationstiderna. 5 vallprover.

Diskussion

Den starka korrelationen mellan iNDF-värde och mängden VOS-rest inom foderslag var förväntad. Däremot var det oväntat att behandling av in vitroresterna med ND-lösning försämrade korrelationen till iNDF in sacco. NDF-analys av in vitroresterna direkt i inkubationsröret innebar att NDF-vikten i medeltal var ungefär 65 mg mot de 200-300 mg som är vanliga vid analys av foderprover. Variationen mellan duplikaten var trots det mycket liten och lägre då ND-behandling ingick än då enbart restmängden organisk substans analyserades. Det är därför inte troligt att slumpmässiga fel i NDF-analysen försämrat korrelationen mellan iNDF och in vitrovärden, utan snarare att det beror på skillnader mellan gräs och vallbaljväxter. Regressionerna blev inte signifikant skilda för gräs och baljväxter, men de prov som hade störst residualer var baljväxtprov. Det finns anledning att tro att ett större provmaterial skulle ge skilda regressioner för gräs och baljväxter. Analys pågår på Kungsängens laboratorium av ytterligare 20 vallprover som långinkuberas och ND-behandlas för att komplettera materialet.

Den minskade restmängden när inkubationen förlängdes från 96 h till 192 h visar att fermentationen fortgick åtminstone en tid efter det ordinarie VOS-intervallet. Däremot fanns inget signifikant försvinnande av provrest mellan 192 och 288 h. Det kan tolkas som att allt fermenterbart material var förbrukat eller att miljöförändringar i inkubationsröret stoppat fermentationen. Inga iakttagelser tydde på någon drastisk försämring av anaerobstatusen i rören vid de långa inkubationerna. Trots det var restmängden efter 288 h inkubation in vitro ca 30 g större/kg invägd organisk substans än motsvarande iNDF-värde in sacco. Själva NDF-analysen gjordes i båda fallen med samma P2 glasfilter (40-100 µm). Till in sacco-inkubationen som föregick iNDF-analysen användes påsar med betydligt mindre porstorlek, 12 µm. Det finns ändå en liten möjlighet att förluster skedde vid påstvättning eller att påshanteringen rymmer någon annan felkälla som ger en bias av den här storleksordningen, annars är alternativet att in sacco-inkubationen verkligen leder till en större nedbrytning. Det kommer att undersökas genom överföring av inkubationsrester från in vitro-rör till påsar som sedan tvättas och hanteras enligt de vanliga rutinerna för iNDF-analys.

Delförsöket med pappersfiltrering tydde på förluster av små partiklar genom de konventionella glasfiltren som tidigare observerats (Udén, 2006). För rutinmässig hantering är glasfilter betydligt lättare att hantera, men om varierande grad av partikelförlust sker hos olika prover ger det upphov till felaktig rangordning av provens fodervärde.

Reinokulation med ny våmvätska minskade inte restmängden utan gav istället mer rest än om samma mängd tillsats från början eller om inkubationsmiljön bara störts genom öppning och bufferttillsats. För att reinokulation skall bidra till nedbrytningen krävs det att den ursprungliga mikrobpopulationen av någon anledning slagits ut, vilket borde innebära att miljön i inkubationsröret är otjänlig för fermentation. En mer logisk utveckling under fermentationen är att en selektion anpassad efter tillgängliga substrat sker.

Slutsatser

Resultaten visar att VOS-värdet kan användas som hjälpmedel för att skatta iNDF och bedöma rimligheten hos NIR-resultat. Med ett större dataunderlag bör skattningarna kunna förbättras. Inkubationer med vanlig VOS-metodik kan förlängas till 192 eller 288 h utan tekniska problem. iNDF-bestämning in vitro ger högre värden in sacco-metoden.

Resultatförmedling till näringen

Regressionsresultaten har meddelats till Svensk Mjölks utfodringsspecialister.

Publikationer

Resultaten kommer att sammanställas med de pågående kompletteringarna och publiceras som "Technical note" i *Animal Feed Science and Technology* eller motsvarande.

Referenser

Chai, W. and Uden, P. 1998. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Anim. Feed Sci. Technol.* 74: 281-288.

Eriksson, T. 2005. Analysmetoder och parametrar i ny kostym Konferensrapport Svensk Mjölks djurhälso- och utfodringsskonferens i Jönköping 050825-26 pp 44. Svensk Mjolk, Hållsta.

Gustafsson, A. H., Volden, H., Mehlqvist, M., Larsen, M., Gudmundsson, G. & Aaes, O. 2005. NorFor - the new Nordic feed evaluation system for cattle. EAAP:s 56:e kongress, 5-8 juni 2005, Uppsala.

Lindgren, E. 1979. Vallfodrets näringsvärde bestämt in vivo och med olika laboriemetoder. Rapport 45. Inst. för husdjurens utfodring och vård, SLU, Uppsala.

Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International* 85:1217-1240

NorFor, 2007. NorFor In Sacco Standard 070910. http://www.norfor.info/Files/pdf-dokumenter/pdf_lab/Analyses/NorFor_in_sacco_standard_070910.pdf. Nedladdad 08-12-30

St-Pierre, N R. 2003. Reassessment of Biases in Predicted Nitrogen Flows to the Duodenum by NRC 2001. *J. Dairy. Sci.* 86:344-350

Tilley, J. M. A. & Terry, R. A., 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104-111.

Uden, P. 2006. Recovery of insoluble fibre fractions by filtration and centrifugation. *Animal Feed Science and Technology* 129, 316-328.

Vogel, K. P., Pedersen, J. F., Masterson, S. D. & Toy, J. J., 1999. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. *Crop Science*, 39:276-279