

Ny teknik för att beskriva proteinnedbrytningen hos mjölkkor, V0930038 (SLUTRAPPORT)

Mårten Hetta, Linda Karlsson, Martin Lorenz, Pekka Huhtanen och Peter Udén

Bakgrund

En förutsättning för att skapa kostnadseffektiva foderstater är tillgången på relevanta foderanalyser. Tillgängligheten för protein i våmmen har under de sista 30 åren i Norden, bestämts med *in sacco* tekniken (Madsen & Hvelplund, 1985). Tekniken bygger på att nätpåsar av nylon innehållande foderprover inkuberas i våmmen under olika tidsintervall. Med hjälp av kinetiska ekvationer beräknar man sen ett värde på proteinets tillgänglighet i våmmen, EPD (Effective protein degradation) som ligger till grund för det vi i Norden kallar AAT (Aminosyror absorberade i tunntarmen). Det finns dock flera problem med *in sacco* metoden, en av de mest uppenbara är partikelförlusterna från påsarna av icke nedbrutet protein och bristen på analytisk förmåga för lösliga proteiner (Broderick *et al.*, 1988). Lösliga proteiner utgör från 20 till 80 procent av råproteinhalten i vanligt förekommande fodermedel (Hedqvist & Uden, 2006). Dessa brister skapar felaktiga skattningar av proteinets tillgänglighet i våmmen, vilket i sin tur leder till felaktiga bedömningar av fodermedlens näringsvärde och pris. Detta exemplifieras kanske tydligast av en publikation av Huhtanen *et al.* (2011) som visar att flera internationella fodervärderingssystem som använder *in sacco* tekniken för att värdera protein överskattar sojamjölets värde i relation till rapsmjölet. Samma tydliga resultat avseende soja och rapsmjöl visas av preliminära data från ett nyligen avslutat utfodringsförsök vid SLU's anläggning i Umeå inom SLF projektet (V1130045), Lägre råproteinhalt i kofoderstater för bättre miljö och mer pengar till mjölkföretagaren.

Förutom de analytiska problemen med *in sacco* tekniken är den dessutom dyr och arbetsam, vilket gör att man i praktiken ofta använder tabellvärden. Detta begränsar möjligheterna till att utvärdera alternativa fodermedel och tillverkningsmetoder. Metoden har även fått kritik för den stora variationen i resultat mellan laboratorier, vilket har lett till att det saknas en internationell standard för metoden. Det finns därför stora behov hos forskare och näring för en ny analysmetod som kan ge relevant uppskattning av proteinnedbrytningen. En metod som kan ersätta *in sacco* metoden är en *in vitro* teknik som bygger på simultana mätningar av gasproduktion och ammoniakkväve ($\text{NH}_3\text{-N}$), (Raab *et al.*, 1983). Metoden har på senare tid utvärderats och modifierats (Karlsson *et al.*, 2009). Tekniken bygger på mätningar av nettoproduktionen av $\text{NH}_3\text{-N}$, vilket är biologiskt mer korrekt (Broderick *et al.*, 1988) i förhållande till den filtrering av fodret som sker med *in sacco* tekniken. Hitintills har dock bara registreringar av gasproduktionen *in vitro* kunna automatiseras varför det finns ett stort behov av att även automatisera mätningar av $\text{NH}_3\text{-N}$ för att göra metoden till en rutinanalys. Trots lovande resultat (Karlsson *et al.*, 2009) med *in vitro* tekniken finns det behov av att utvärdera de antaganden som ligger till grund för analyserna. Bland annat finns det behov av att studera den mikrobiella omsättningen och proteinsyntesen i relation till nedbrytningen av foderprotein. Det mikrobiella ekosystemet i våmmen är komplext och omfattar bakterier, svampar och protozoer. En metod att testa betydelsen av den mikrobiella omsättningen av protein är att ta bort en grupp av organismer e.g. protozoer genom så kallad defaunering. En annan metod för utvärdering av biologiska antagandena är utnyttjandet av dynamiska datamodeller. Syftet med det här projektet var därför att utvärdera olika metoder att automatiskt mäta ammoniakkoncentrationer *in vitro* samt att med stöd av modellering utvärdera applikationer av *in vitro*-system för studier av proteinnedbrytning i våmmen.

Material och metoder

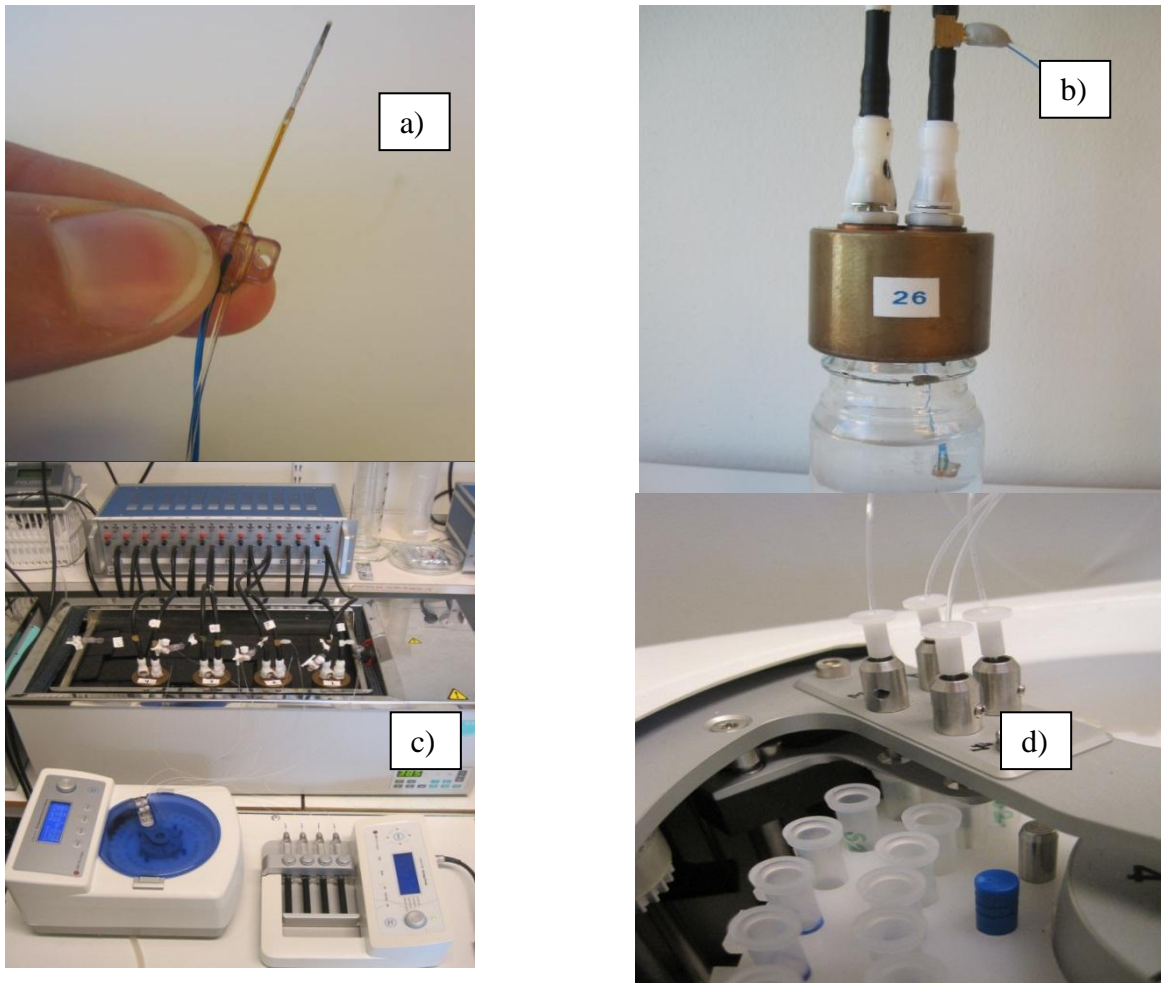
Standardisering av våmvätska genom förinkubering och defaunering

Vi valde att testa möjligheten att standardisera våmvätskan som används *in vitro* genom att reducera mängden protozoer i kombination med förinkubering med kolhydrater av våmvätskan. Sojamjöl är ett väl etablerat fodermedel som det finns mycket experimentella data att jämföra resultaten med. Vi utgick från den experimentella ”set up” som finns redovisad av Karlsson *et al.*, (2009) och 400 mg sojamjöl inkuberades med våmvätska, bufferlösning och kolhydrater i ökade mängder 100, 200, 300, och 400 mg i 250 ml kolvar anslutna till ett system för automatisk registrering av gasproduktionen. Varje experimentomgång (körning) omfattade två upprepningar av varje behandling samt två blankar (bara våmvätska och buffer), experimentet upprepades två gånger. Våmvätska samlades från tre fistulerade kor (SRB) och blandades. För att testa effekten av förekomsten av protozoer delades våmvätskan i två lika delar. Den ena delen förvarades anaerobt i en termos, under det den andra delen defaunerades med hjälp av centrifugering. Centrifugering vid hög hastighet sedimenterar protozoer och foderpartiklar och i supernatanten återfinns i stort sätt bara vätska och bakterier.

Efter centrifugeringen kontrollerades förekomsten av protozoer i behandlad och behandlad våmvätska med mikroskop. Därefter förinkuberades båda kvaliteterna av våmvätska var för sig (0.6 l) under 3 timmar med en tillsats av kolhydrater med syfte att sänka ammoniakkoncentrationen ytterligare Karlsson *et al.*, (2009). Därefter blandades våmvätskorna med buffer och mixen tillsattes till kolvarna med foder. Gasproduktionen mättes kontinuerligt under 24 timmar och prover för bestämning av ammoniakkoncentrationen togs ut vid intervallen, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 18 och 24 timmar från varje flaska. En mer utförlig redovisning av de analytiska procedurerna i experimentet finns redovisat av Lorentz *et al.*, (2011). Nedbrytningen av protein *in vitro* vid varje intervall från 1 till 24 timmar bestämdes med ekvationen beskriven av Raab *et al.* (1983). För att utvärdera effekterna av tidsintervall, defaunering och substratmängder på ammoniakkoncentrationen och gasproduktion användes en statistisk modell, anpassad för upprepade mätningar (Lorentz *et al.*, 2011).

Automatiserad mätning av ammoniakkväve in vitro

I projektet gjordes tre experiment (1-3) med automatiserade tekniker för mätning av ammoniakkoncentrationen *in vitro* i kombination med en auto-analys (SEAL analytical, GmbH Norderstedt Germany). En mer utförlig redogörelse av metodiken finns redovisad av Karlsson *et al.*, (2012). Inledningsvis gjorde vi: 1) test av en mikrodialysapplikation i standardlösningar med kända koncentrationer av NH₃-N, 2) Därefter gjorde vi en jämförelse av manuell provtagning med sprutor på samma sätt som gjorts av Karlsson *et al.*, (2009) med automatiserad provtagning av ammoniakkväve med mikrodialys teknik för att bestämma nedbrytningen av protein hos sojamjöl *in vitro* och 3) en utvärderades möjligheterna att mäta koncentrationen av NH₃ direkt on-line med en jonselektiv ammoniumelektrod. Mikrodialyssystemet i studien tillhandahölls av Inst. för skogens ekologi och skötsel och hade levererats av CMA Microdialysis AB (Solna, Sverige) och bestod av en infusionspump med fyra kanaler (CMA 400) och en automatisk provuppsamlare (CMA 470). Varje kanal i pumpen bestod av en 5 ml spruta som var ansluten till en mikrodialys probe (CMA 20) med ett membran som släpper igenom molekyler med en vikt lägre än 20 kDa. Detaljerade bilder av systemet finns redovisade i figur 1.



Figur. 1. Mikro dialysprob (a), Microdialysprob (b) intergerad en *in vitro* kolv, Mikro dialyssystemet med mikropump (c), vattenbad med *in vitro* kolvar kopplade till en databox för registrering of gasproduktion och en automatisk provuppsamlare med Eppendorfrör i karusell, ett för varje tidsintervall (d).

Test av mikro dialyssystemet för dialys av standardlösningar

Standardlösningar med ökande koncentrationer av $\text{NH}_3\text{-N}$, 5, 50, 100, 300 and 500 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ bereddades för att testa variationen i överföring (recovery rate, RR) av $\text{NH}_3\text{-N}$ inom och mellan fyra enskilda membran i mikro dialyssystemet i figur 1. Lösningarna placerades i ett vattenbad och provtagningen pågick i 4 timmar. Som bärare (perfusat) användes destillerat vatten och överföringen RR (%) av $\text{NH}_3\text{-N}$ mellan lösningen och bäraren beräknades enligt Inselsbacher *et al.* (2011).

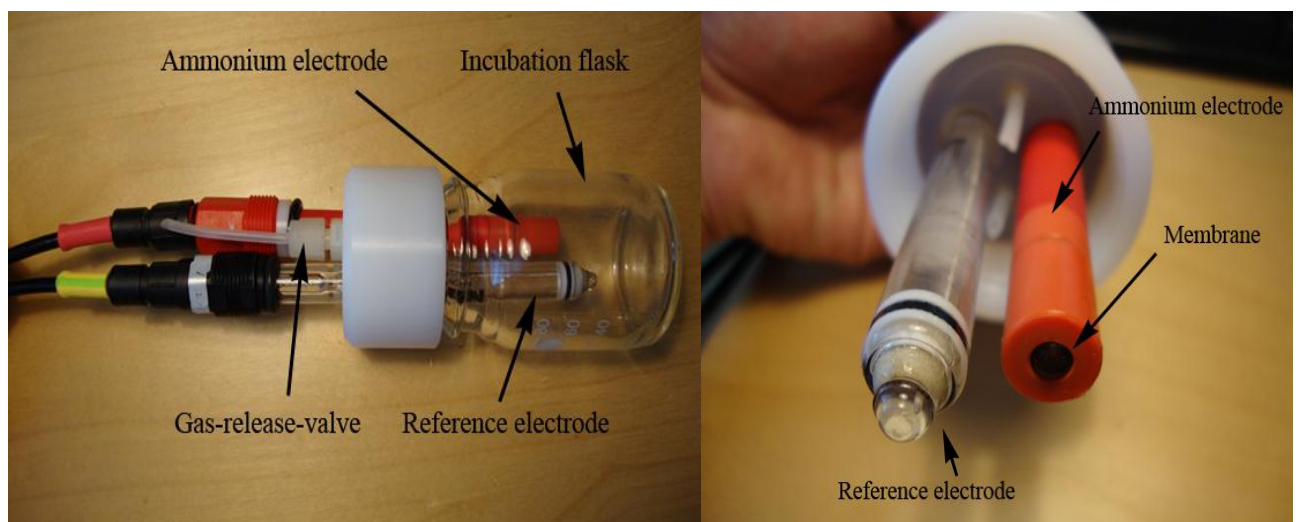
Test av mikro dialyskonceptet i ett in vitro-system för proteinanalyser

Mikro dialyssystemet installerades därefter i ett *in vitro*-system beskrivet av Karlsson *et al.* (2009) för att bestämma proteinnedbrytningen i våmmen. Installationen möjliggjorde simultan manuell provtagning av våmvätska med sprutor och automatisk provtagning med mikro dialyssystemet tidigare beskrivet (figur 1) i fyra *in vitro*-kolvar. Vi samlade våmvätska (0.8 l) från vardera två fistulerade kor (SRB). Vätskorna filtrerades, blandades för att sen pre-inkuberas med kolhydrater enligt Karlsson *et al.* (2009). Därefter blandades vätskan med en buffrad minerallösning (Menke and Steingass, 1988) för att uppnå en andel på 1/3 (v/v) våmvätska.

I *in vitro*-kolvarna (100 mL) vägde vi in omkring 400 mg sojamjöl med ökande andel kolhydrater 100, 200 eller 300 mg. Vi inkuberade foderproverna med den buffrade våmvätskan under 24 h. Dessutom inkluderade vi inkubationer av sojamjöl utan kolhydrater. Vi upprepade försöket i två körningar. Gas produktionen från mikroberna mättes kontinuerligt. Mikrodialyssystemet tog prover på ammoniak koncentrationen med två timmars intervall under 24 h. Samtidigt tog vi manuella prover av den buffrade våmvätskan med sprutor under utvalda intervall. De manuella och automatiska proverna analyserades för ammoniakkoncentrationen med en auto-analyser (SEAL analytical, GmbH Norderstedt, Germany) som använder en kromatisk/fotospektrometrisk analysmetod.

Mätningar med ammonium elektrod on-line

Vi inledde denna del av projektet med att testa olika jonselektiva ammoniumelektroder mot standardlösningar med varierande koncentrationer av $\text{NH}_3\text{-N}$. Inledningsvis testade vi en elektrod typ, 4-Star pH/ISE (Thermo Scientific Orion). Elektroden visade sig svår att hantera och vi fick inga goda resultat mellan uppmätta värden och standardlösningar med $\text{NH}_3\text{-N}$. Vi testade därefter en annan elektrod som använder sig av en något annan teknik med en referenselektrod och en mätelektrod (Nadler, Zuzwil, Switzerland). Den senare gav mer robusta värden och vi valde därför att gå vidare med den teknologin. I en av kolvarna (100 mL) monterade vi de två elektroderna för att kunna mäta ammoniakkoncentrationen on-line (Figur 2). En elektrod fungerar som referens och innehåller referenslösning med ammonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), den andra innehåller ett membran där förändringar den elektriska potentialen i relation till över ett membran i relation till ammoniakkoncentrationen i *in vitro*. Vi kalibrerade elektroden mot standardlösning och mätte sen ammoniakkoncentrationen var femte sekund under 24 h i en *in vitro* kolv med 400 mg sojamjöl och buffrad våmvätska. Parallellt med mätningar med elektroden gjordes togs manuella provtagningar ur kolven med sprutor som tidigare beskrivits.

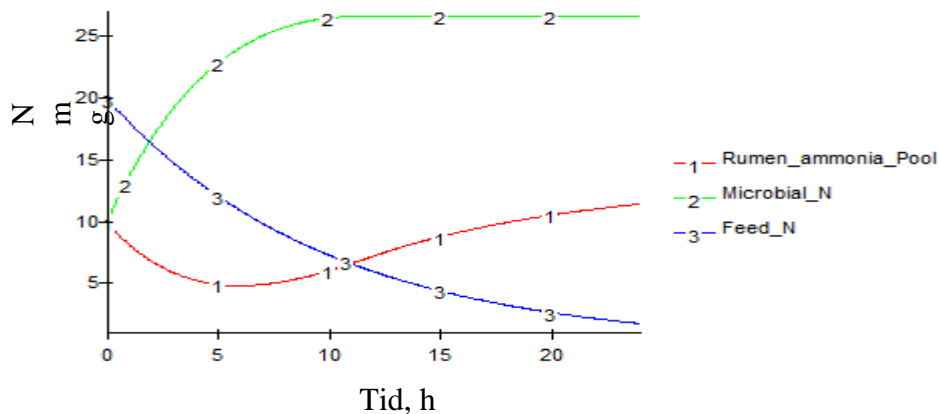


Figur. 2. Ammoniumelektrod, membran and referenselektrod monterad i en *in vitro* kolv

Modellering av proteinnedbrytningen in vitro

För att utvärdera de teoretiska antaganden som ligger bakom metoden enligt Raab *et al.* (1983) genomfördes ett modelleringsstudie. Modellen omfattar en *in vitro* kolv där man kan bestämma olika ingångsvärden och sen dynamiskt beräkna produktionen av gas, $\text{NH}_3\text{-N}$ samt proteinnedbrytningen. Modellen finns till stora delar beskriven av Huhtanen och Ramin (2012). Ingångsvärdena omfattar, olika typer av kolhydrater, mängden protein,

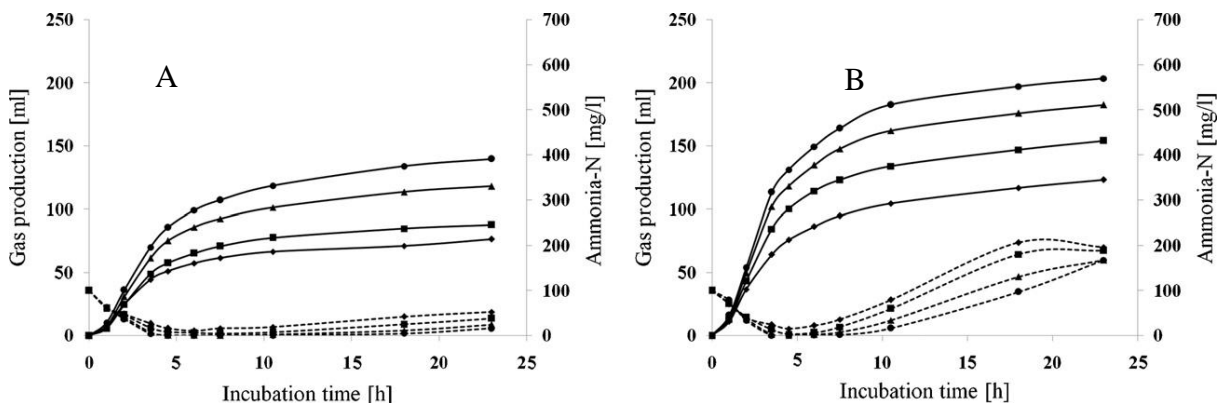
nedbrytningshastigheter för kolhydrater och protein samt mikrober och deras syntes. I figur 3 nedan visas tre olika proteinpooler (mg N) och hur de varierar över tiden under en simulering. Modellen kördes med sex olika ”settings”, bland annat med och utan gasproduktion från protein och mikrober och med variabel mängd mikrober och därmed ett förändrat behov av energi (ATP) för underhåll hos mikroberna. Resultaten jämfördes med matematiska beräkningar av proteinnedbrytningen enligt de antaganden som gjorts av Raab *et al.* (1983).



Figur 3. Exempel på dynamiken i modellen för $\text{NH}_3\text{-N}$, foderprotein och mikrober.

Resultat

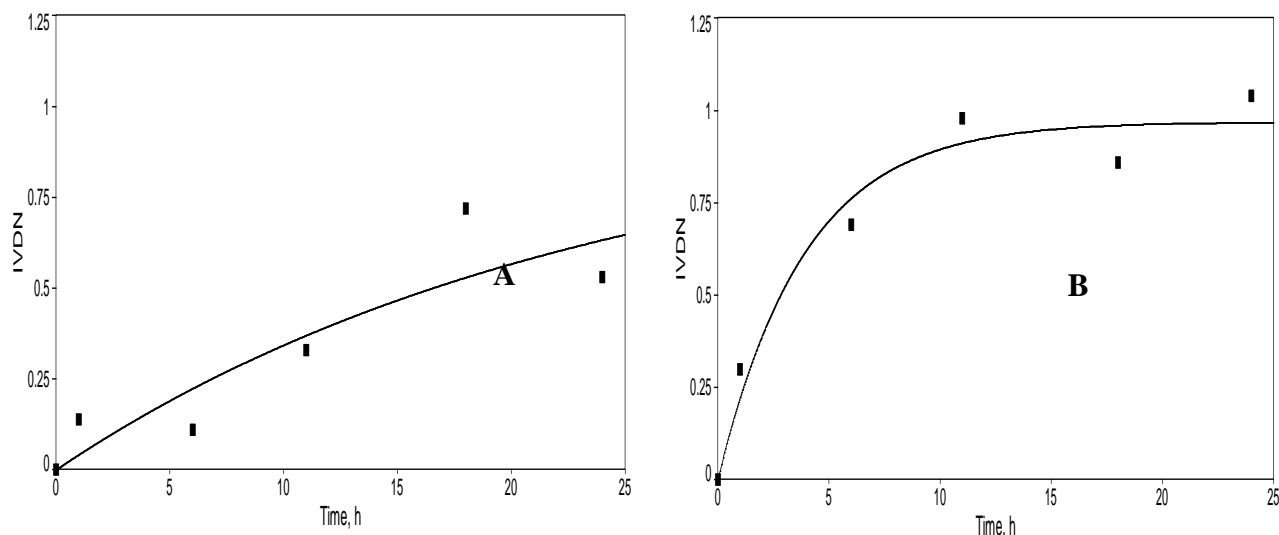
Standardisering av våmvätska genom förinkubering och defaunering genom centrifugering
 Mikroskoperingen visade tydligt att centrifugeringen av våmvätskan minskade förekomsten av protozoer till den grad att inga protozoer var synliga efter behandlingen, vilket tyder på att defauneringen var närmast fullständig. Analyserna av våmvätskorna innan inkubation visade på att förinkuberingen med kolhydrater, dramatiskt sänkte koncentrationen av $\text{NH}_3\text{-N}$ till lägre än 10 mg/l, innan buffer-minerallösningen tillsattes. Efter att blandningen buffer-minerallösningen tillsatts steg koncentrationen av $\text{NH}_3\text{-N}$ tiofaldigt till 100 mg/l.



Figur 4. Graferna ovan visar gasproduktion av sojamjöl med fyra olika nivåer av kolhydrater i defaunerad (A) och normal våmvätska (B) samt koncentrationen av $\text{NH}_3\text{-N}$ under 24 timmar *in vitro*.

Produktionen av gas *in vitro* under 24 h och samt koncentrationen av $\text{NH}_3\text{-N}$ från sojamjöl med olika nivåer av kolhydrater visas i figur 4. Koncentrationen av $\text{NH}_3\text{-N}$ sjönk under de inledande timmarna av inkubering. I den defaunerade våmvätskan steg inte koncentrationen av $\text{NH}_3\text{-N}$ nämnvärt därefter, medan i den obehandlade vätskan så steg

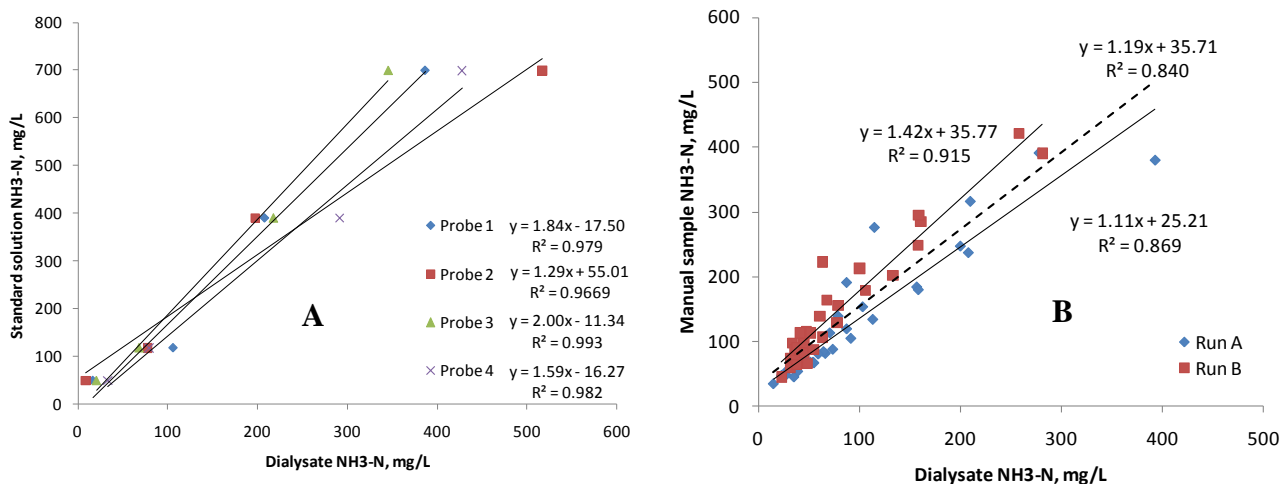
koncentrationen till det fyrdubbla efter ca 24 timmar. Även gasproduktionen påverkades av defauneringen, vilket tydligt visas i diagrammen. Den normala våmvätskan hade en betydligt högre gasproduktion vid samtliga nivåer av kolhydrater. Skillnaderna i gasproduktion och koncentrationer av $\text{NH}_3\text{-N}$ mellan i defaunerad och normal våmvätska hade en tydlig effekt på den skattade nedbrytningen av protein vilket visas i figur 5. Om man tittar på kinetiken av proteinnedbrytningen, så finner man att proteinnedbrytningen av sojamjöl gick cirka sex gånger snabbare med protozoerna (den normala våmvätskan), än i den defaunerade våmvätska. Den skattade asymptotiska nedbrytningen var dock jämförbar mellan de båda typerna av våmvätska. I studien gjordes även en jämförelse mellan skattad proteinnedbrytning när man tog hänsyn till gasproduktion och koncentrationer av $\text{NH}_3\text{-N}$ i blankar, d.v.s. bara våmvätska utan foder i flaskorna. Skattad proteinnedbrytning med blankkorrigerad gav betydligt lägre proteing i förhållande till okorrigerade beräkningar. Dessutom skapade blankkorrigeringen en förskjutning i tiden så att en tydlig lagfas uppträdde i de blankkorrigerade profilerna. Förutom en jämförelse mellan de absoluta värdena gjordes en utvärdering av reproducerbarheten mellan mätningar och den defaunerade våmvätskan hade något mindre variation mellan upprepningar. En mer utförlig redovisning av de resultaten i experimentet finns redovisat av Lorenz *et al.*, (2011).



Figur 5. Graferna ovan visar skattad proteinnedbrytning (IVDN) för sojamjöl i defaunerad våmvätska (A) normal våmvätska (B) beräknat enligt Raab *et al.*, (1983) vid olika intervall under 24 h. Kurvorna i diagrammen visar första ordningens kinetik.

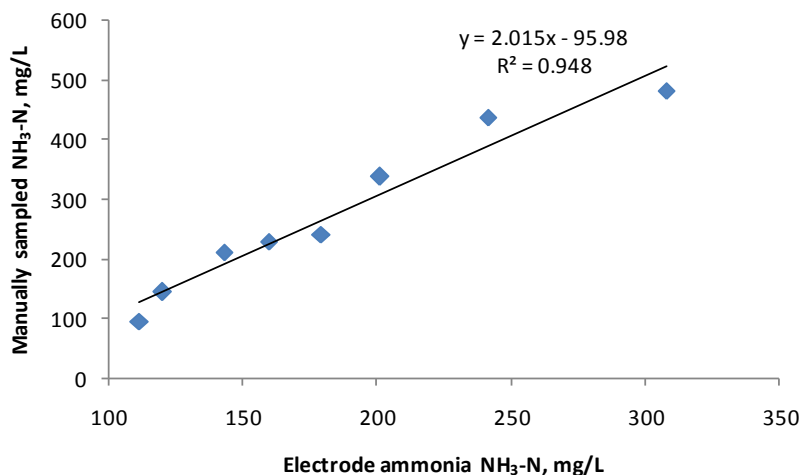
Automatiserad mätning av ammoniakkväve in vitro

Mätningarna med mikrodialystekniken visar att det var ett mycket gott samband mellan ammoniakkoncentration i diffusanten och standardlösningarna (Figur, 6 A). Data visar dock att det finns en variation i diffusion mellan individuella membraner (prober). Jämförelsen mellan mikrodialystekniken och manuell provtagning med sprutor visade på bra samband men en större variation i relation till mätningarna med standardlösningarna (Figur, 6 B). En viktig observation i sammanhanget var att för provtagning med dialystekniken i kombination med buffrad våmvätska så minskade mängden diffusant med ungefär en tredjedel, vilket tyder på att vatten diffunderar över membranet in i *in vitro* kolven. Denna transport ökar koncentrationen av $\text{NH}_3\text{-N}$ i diffusanten och påverkar därmed även diffusionshastigheten.



Figur 6. I diagrammen ovan redovisas de linjära sambanden mellan koncentrationen av NH₃-N i diffusanten (bärrävska efter dialys) i relation till standardlösningar för fyra prober (A) och till manuella prov från *in vitro* kolvar med buffrad vätska i två körningar (B).

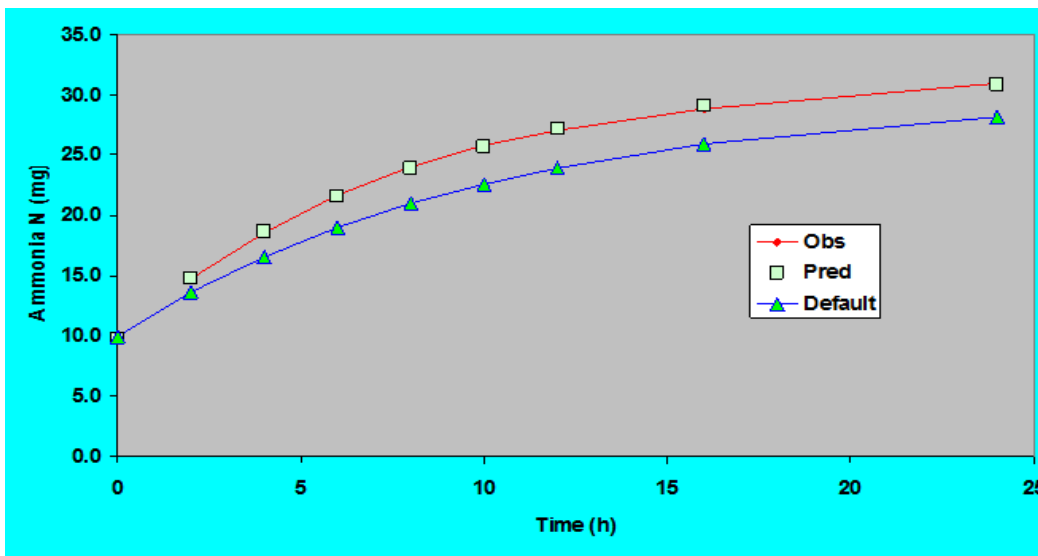
När det gäller ammoniumelektroden så visade tekniken på ett gott linjärt samband (Figur 7). Vi hade dock bara tillgång till en enskild elektrod varför vi inte skattade reproducerbarheten mellan enheter på samma sätt som med mikrodiagnostik.



Figur 7. NH₃-N mätt med ammoniumelektroden *in vitro* i relation till manuell provtagning.

Modellering av proteinnedbrytningen *in vitro*

Ett exempel på resultaten av en av de sex modelleringarna visas i figur 8. I exemplet har vi gjort ett antal antaganden som inte ingår i koncepten enligt Raab et al., (1983). Antagandena i den nya *in vitro*-modellen är 1) gas produceras även från protein inte bara kolhydrater, 2) förhållandet mellan produktionen av korta fettsyror och gas varierar över tiden med mikropopulationens storlek och att 3) N i mikroberna omsätts (dör och bryts ned) över tiden med en annan hastighet än foderprotein och blir NH₃-N. Resultaten visar att om man gör dessa antaganden i modellen får man i praktiken en överskattning av fodrets EPD-värde. Resultaten visar även att mängden nedbrutet protein i modellen överskrider mängden foderprotein, vilket leder till felaktiga skattningar. Om man sammanfattar resultaten av modelleringen så har variationen i förhållandet mellan produktionen av korta fettsyror och gas störst betydelse för metodens resultat.



Figur 8. Bilden ovan visar exempel på den beräknade $\text{NH}_3\text{-N}$ produktionen *in vitro* från förutsättningarna enligt Raab *et al.*, (1983) (Default) och den beräknade $\text{NH}_3\text{-N}$ produktionen under mer biologiskt korrekta antagna förhållanden (Obs och Pred).

Diskussion

Standardisering av våmvätska genom förinkubering och defaunering

Resultaten visar att förinkuberingen av våmvätska med kolhydrater sänker koncentrationen av $\text{NH}_3\text{-N}$, vilket teoretiskt borde öka möjligheterna att applicera beräkningar av proteinnedbrytning baserat på mätningar av ammoniakkoncentrationer även på proteinfodermedel med lägre proteinhalter, vilket är föreslagit av Karlsson (2010). Den relativt höga ammoniakkoncentrationen i buffertlösningen tar dock bort en del av den positiva effekten. Defauneringen med centrifugering lyckades och om man studerar nivån på ammoniakkoncentrationen i de defaunerade *in vitro*-systemet, verkar det som omsättningen av mikrob-N minskar, på grund av minskad predation på bakterier, vilket skulle öka känsligheten för *in vitro*-metoden. Men, om man i stället tittar på den skattade proteinnedbrytningen finner man att i den defaunerade vätskan minskar proteinets skattade tillgänglighet i våmmen betydligt. Firkins *et al.* (2007) har konstaterat att det är föga troligt att man får ett bättre proteinutnyttjande i praktisk mjölkproduktion genom att ta bort protozoerna.

Automatiserad mätning av ammoniakkväve in vitro

Mikrodialysen har de fördelarna i relation till manuell provtagning att mätningarna kan automatiseras och dessutom införs direkt i en auto-analys utan föregående centrifugering eller filtrering, då partiklar och mikrober inte kan passera membranet. Variationen i diffusion mellan individuella membran och diffusionen av vatten från bäraren (perfusat) till *in vitro*-systemet visar på att ytterligare utvecklingsarbete återstår. En av möjligheterna att minska problemet med transport av vatten över membranet, är att använda en perfusat-lösning med samma osmotiska egenskaper som buffrad våmvätska. En annan fördel med mikrodialysen är att produktionen av andra föreningar så som korta fettsyror och aminosyror kan analyseras. Det pågår ett intensivt utvecklingsarbete med nya applikationer av tekniken inom medicin och kirurgi (e.g. Abrahamsson 2010). För vidare arbete med tekniken är det därför av stort värde att samarbeta med forskningsmiljöer som använder andra tillämpningar av metodiken, men har högre kunskap om de fysiska och kemiska principerna för mikrodialys i biologiska system.

Mätningar med ammoniumelektroden var den teknik som i många perspektiv har störst potential för integration i ett *in vitro*-system med simultan mätning av gas och NH₃-N i större omfattning. Tekniken har många fördelar mot traditionella analyser då man får resultaten direkt on-line, utan behov av efterföljande behandling av provet. Man har dessutom ingen transport av vätska till och från *in vitro*-systemet, vilket gör applikationen robust. I vår studie hade vi bara tillgång till en elektroduppsättning, varför många frågor och utmaningar blev obesvarade och är ännu inte prövade. Bland annat är det viktigt att testa reproducerbarheten mellan individuella elektroder och även studera hur kvalitén på mätningarna påverkas över tiden med tänkbar bakterietillväxt på membran och dylikt. Sammanfattningsvis visar resultaten att båda testade metoderna för att mäta produktionen av NH₃-N *in vitro* har god potential för automatiserade registreringar. Så väl mikrodialys som jonselektiva elektroder är dock tekniskt avancerade metoder, varför ett fortsatt arbete med teknikerna skulle få betydligt bättre förutsättningar med en ökad involvering av kompetens från vetenskapliga miljöer som arbetar explicit med mätning och provtagning med de testade metoderna.

Modellering av proteinnedbrytningen in vitro

Modelleringsarbetet inom projektet har visat på flera viktiga aspekter för att beskriva proteinnedbrytningen hos mjölkkor. Simuleringarna visar att man måste ifrågasätta flera av de antagen som ligger bakom metoden enligt (Raab et al., 1983). Bland annat konceptet om ett konstant förhållande mellan produktionen av korta fettsyror och gas, som i stället varierar över tiden med mikrobpopulationens storlek. I flera av simuleringarna fick vi en proteinnedbrytning som var större än 1.0 (100%), när vi justerade förutsättningarna i modellen till mer biologiskt korrekta antaganden. Dessa simulerade resultat är teoretiskt orimliga men inte praktiskt orealistiska då Karlsson *et al.* (2009) har fått liknande resultat med *in vitro*-studier av sojamjöl. Vi har tidigare antagit att de felaktiga skattningarna i första hand beror på tekniska utmaningar med att korrekt mäta ammoniakproduktionen. Resultaten från modelleringsarbetet visar på alternativa möjligheter att skatta proteinnedbrytningen för att kringgå problem som en växande mikrobpopulation, som sen bryts ned och lyserar under mätningarna. Ett alternativ som nu utvärderas vid SLU, är att i stället för att öka mängden kolhydrater gradvis istället öka mängden protein och skatta nettoproduktionen av NH₃-N i relation mängden tillsatt foder N som ett mått på proteinkvaliten.

Slutsatser i relation till ställda hypoteser i ansökan

Mätningar av nettoproduktionen av NH₃-N *in vitro* ger en biologisk mer korrekt beskrivning av proteinnedbrytningen (tillgängligheten) i våmmen i förhållande till filtrering av foder i nylonnäpåsar (*in sacco*). *Våra data visar att proteinnedbrytningen (tillgängligheten) i våmmen kan skattas med mätningar av nettoproduktionen av NH₃-N in vitro och gasproduktion, men att ytterligare forskning och utveckling är nödvändig för skatta relevansen av metoden och öka reproducerbarheten.*

Applikationer av moderna membranbaserade analys- och provtagningstekniker möjliggör automatisering av gasproduktionstekniken för proteinanalys, vilket ökar tillgängligheten av tekniken för både forskning och näring. *Resultaten visar tydligt att produktionen av NH₃-N in vitro kan automatiseras både med membranbaserade analys- och provtagningstekniker samt med jonselektiva elektroder med direkt mätning on-line.*

Publikationer

Karlsson, L., 2010. Hempseed cake as a protein feed for ruminants. Diss. Umeå : Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae, 1652-6880 ; 2010:86.

Delar av avhandlingsarbetet är finansierat av projektet.

Lorenz, M.M., Karlsson, L. Hetta, M. & Udén, P. 2011. Recycling of microbial N and the estimation of protein degradation by the gas in vitro method. *Animal Feed Science and Technology*, 170. 111– 116. *Hela arbetet med artikeln är finansierat av projektet.*

Lorenz, M., 2011. Sainfoin tannins and their impact on protein degradation during silage and rumen fermentation and testing of novel techniques. Diss. Uppsala, Sweden : Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae, 1652-6880 ; 2011:72

Delar av avhandlingsarbetet är finansierat av projektet.

Karlsson, L., Lorenz, M.M., Uden, P. & Hetta, M. 2012 Automated recordings of NH₃-N concentrations in rumen *in vitro* systems, a pilot study. Departemental report. Department of Agricultural Research for Northern Sweden, PP 1-13.

Hela arbetet med rapporten är finansierat av projektet.

Övrig resultatförmedling till näringen

Arbetet med att utveckla nya *in vitro*-metoder har i första hand redovisats vid seminarier. Bland annat gjordes en muntlig presentation vid Jordbruksverkets FoU dag 2012 i Mjölby, vid konferensen deltog både rådgivare och forskare. Arbetet i projektet har skapat ett stort intresse hos industri och näring som arbetar med tillverkning av djurfoder och – tillsatser. Vi har därför vi flera tillfällen redovisat arbetet för företag och organisationer som arbetar med foderfrågor, bland annat Svensk Mjöl, AarhusKarlshamn AB och Akzo Nobel AB.

Referenser

Abrahamsson, P., 2010. Methodological aspects on microdialysis. UMEÅ UNIVERSITY MEDICAL DISSERTATIONS NEW SERIES NO. 1380. PP. 1- 59.

Broderick, G.A., Wallace, R.J., Orskov, E.R. & Hansen, L., 1988. Comparison of estimates of ruminal protein degradation by in vitro and in situ methods. *J. Anim.Sci.* 66, 1739-1745.

Firkins, J.L., Yu, Z. & Morrison, M., 2007. Ruminal Nitrogen Metabolism: Perspectives for Integration of Microbiology and Nutrition for Dairy. *J. Dairy Sci.* 90 (E. Suppl.), E1–E16.

Hedqvist, H. & Uden, P., 2006. Measurement of soluble protein degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126, 1-21.

Huhtanen, P., Hetta, M. & Swensson, C. 2011. Evaluation of canola meal as a protein supplement for dairy cows: a review and meta-analysis. *Can J. Anim. Sci.* 91, 529-543.

Huhtanen, P. & Ramin, M. 2012. Development of an in vitro method for determination of methane production kinetics using a fully automated in vitro gas system — A modelling approach. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174, 190-200.

Inselsbacher, E., Öhlund, J., Jämtgård, S., Huss-Danell, K., Näsholm, T., 2011. The potential of microdialysis to monitor organic and inorganic nitrogen compounds in soil. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1321-1332.

Karlsson, L., Hetta, M., Udén, P. & Martinsson, K. 2009. New methodology for estimating rumen protein degradation using the in vitro gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153, 193-202.

Madsen, J. & Hvelplund, T., 1985. Protein degradation in the rumen: a comparison between in vivo, nylon bag, in vitro and buffer measurements. *Acta Agric. Scand. Suppl.* 103-124.

Menke, K.H. & Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Res. Dev.* 28, 7-25.

Raab, L., Cafantaris, B., Jilg, T. & Menke, K.H., 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro. *Br. J. Nutr.* 50, 569-582.