



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp
Fakultet for biovitenskap

Sammenligning av *in vitro* og *in vivo* fordøyelighet av surfôr hos drøvtyggere

Comparison of *in vitro* and *in vivo* digestibility of grass-based silages in ruminants

Ole Berner Strand Bondø
Husdyrvitenskap

Forord

Arbeidet med masteroppgaven startet opp mai 2020 med forsøksarbeid og ble avsluttet desember 2020. Oppgaven symboliserer slutten av masterstudiet innenfor husdyrvitenskap på Institutt for Husdyr- og Akvakulturvitenskap (IHA) ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU). Det er mange involverte som har vært med på å bidra til at denne masteroppgaven ble ferdigstilt, en stor takk går ut til alle sammen!

En ekstra stor takk går ut til:

- Egil Prestløyken som har satt av mye tid for å hjelpe meg med formuleringer, statistikk og fagkunnskap, og for å alltid være tilgjengelig.
- Alemayehu Sagaye for god hjelp med statistikk og fagkunnskap, og for å alltid svare og sette av tid til å diskutere forskjellige problemstillinger.
- Elise Hatch Fure for hjelp og veiledning på laboratoriet, og for datamateriale fra ytterligere fôrprøver innen samme prosjekt.
- Liv Torun Mydland for planlegging og tilrettelegging for finansiering av forsøket.
- Foods of Norway og Tine for å bistå med fôrmateriale.

Institutt for Husdyr- og Akvakultur

Norges Miljø og Biovitenskapelige Universitet

15.12.2020

Ole Berner Strand Bondø

Sammendrag

Det finnes ulike måter å undersøke fordøyelighet hos drøvtyggere. *In vivo* fordøyelighet måler fordøyelighet i levende dyr og anses som referansemetode ved fordøyelighetsforsøk. Metoden måler hvor mye av næringsstoffene som blir fordøyd. Dette er en metode som er tidkrevende, ressurskrevende og ikke minst kostbar. *In sacco* er en metode som går ut på å inkubere fôrprøver i små filterposer som plasseres i vomma til et levende vertedyr. Metoden krever også forsøksdyr, og er kostbar. *In vitro* fordøyelighet handler om å estimere fordøyeligheten på laboratoriet, og er en metode som er mindre tidkrevende og billigere, men varierer i større grad hvor presise de er sammenlignet med *in vivo*.

Fordøyelighet av 54 forskjellige fôr med varierende geografisk opprinnelse og kvalitet ble testet. De ulike metodene undersøkt var Daisy^{II}, *in vitro* gassproduksjon (iGP), *in sacco* og *in vivo* fordøyelighetsforsøk. Formålet med denne masteroppgaven var å sammenligne korrelasjoner mellom Daisy^{II} og iGP, *in sacco* og *in vivo* fordøyelighet for å bestemme fordøyelighet av næringsstoff hos drøvtyggere.

Fôrprøvene ble malt på 1.0 mm for Daisy^{II} og iGP, og 1.5 mm for *in sacco*. Det ble benyttet ANKOM filterposer (F57) med porestørrelse på 25 µm inkubert (12, 24, 48 og 96 t) for Daisy^{II}. For *in sacco* ble det benyttet nylonposer med en porestørrelse på 38 µm (2, 4, 8, 16, 24, 48 og 96 + 288 t). Gassproduksjonen ble gjennomført ved bruk av ANKOM RF gassproduksjonssystem (72 t).

Best korrelasjon mellom metodene ble oppdaget mellom Daisy^{II} 48 timer inkubasjon (DaisyDM48) og beregnet tørrstoffordøyelighet med 8 % passasje per time for *in sacco* (DigDM8) ($r = 0.90$). Med *in vivo* korrelerte *in sacco* og Daisy^{II} best ($r = 0.71$ og 0.69). Lav korrelasjonen mellom iGP og *in vivo* ble beregnet for alle tidsintervaller for iGP. Det ble derimot funnet høy korrelasjon mellom iGP og de andre metodene. Avvikene mellom observasjonene ble beregnet for å finne hvilke to metoder som hadde best lineær sammenheng. Høyest R^2 ble observert mellom Daisy^{II} og *in sacco* ($R^2 = 0.82$).

Både Daisy^{II} og iGP viste seg å være egnet til å kunne predikere fordøyeligheten hos drøvtyggere. Daisy^{II} er å foretrekke da den ga høyest korrelasjon med både *in vivo* og *in sacco*, samt at det er behov for mindre avansert utstyr. Det var høy variasjon i fordøyelighet for de ulike prøvene testet, og gir lav lineær sammenheng som ga upresise prediksjonsligninger.

Abstract

There are different methods to consider when investigating digestibility in ruminants. *In vivo* digestibility measures digestibility in living animals and is the reference method for measuring digestibility. The method measures which nutrients are digested. This is a time consuming, resource consuming and, most importantly, an expensive method. *In sacco* is a method that involves incubating feed samples in small filter bags that are placed in the rumen of a live host animal. This method requires experimental animals, it is therefore a method that is relatively expensive. *In vitro* digestibility estimates the digestibility in the laboratory, this is a less time consuming and cheaper method, but varies in accuracy compared to *in vivo*.

Digestibility of 54 different grass-based silages with varying geographical origin and quality were tested. The various methods for testing digestibility are Daisy^{II}, *in vitro* gas production (iGP), *in sacco* and *in vivo* digestion. The aim of this master's thesis was to compare the *in vitro* methods Daisy^{II} and iGP with *in sacco* and *in vivo* digestibility to estimate the digestibility of dry matter (TS), NDF and nitrogen.

Feed material was mainly silage, as well as straw and one maize silage. The feed samples were ground at 1.0 mm for Daisy^{II} and iGP, and 1.5 mm for *in sacco*. ANKOM filter bags (F57) with a pore size of 25 µm were used which were incubated (12, 24, 48 and 96 h) in a Daisy^{II}. For *in sacco*, nylon bags with a pore size of 38 µm were used (2, 4, 8, 16, 24, 48 and 96 + 288 h). The iGP was implemented using the ANKOM RF gas production system (72 h).

The strongest correlation between the methods was detected between Daisy^{II} 48 hours incubation (DaisyDM48) and calculated dry matter digestibility with 8% passage per hour *in sacco* (DigDM8) ($r = 0.90$). The strongest correlation with *in vivo* was *in sacco* and Daisy^{II} ($r = 0.71$ and 0.69). Low correlation between iGP and *in vivo* was calculated for all iGP time intervals. However, a higher correlation was found between iGP and the other methods. The discrepancies between the different observations were also calculated to find a linear relationship. The highest R^2 was observed between Daisy^{II} and *in sacco* ($R^2 = 0.82$).

Both Daisy^{II} and iGP ended up being suitable for predicting the digestibility of ruminants. Daisy^{II} is preferable as it provided the highest correlation with both *in vivo* and *in sacco*, as well as the need for less advanced equipment. On the other hand, large variation in digestibility values for the different samples made it difficult to make equations that are precise enough to predict *in vivo* digestibility.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Abstract.....	III
1.0 Introduksjon og mål for oppgaven.....	1
2.0 Bakgrunn og teori.....	2
2.1.0 Grovfôr.....	2
2.1.1 Grasetts morfologi.....	2
2.1.2 Hovednæringsstoffene i fôr.....	4
2.1.3 Drøvtyggerens fordøyelsesfysiologi.....	5
2.1.4 Omsetning i vom.....	6
2.1.5 Fôrmiddelvurdering.....	9
2.2.0 <i>In vivo</i> fordøyelighet.....	11
2.2.1 <i>In sacco</i>	12
2.2.2 <i>In vitro</i> fordøyelighet.....	13
3.0 Material og metode.....	16
3.1.0 Forsøksbeskrivelse.....	17
3.1.1 Daisy ^{II}	17
3.1.2 <i>In vitro</i> gassproduksjon.....	18
3.1.3 <i>In sacco</i>	19
3.1.4 <i>In vivo</i> fordøyelighetsforsøk.....	19
3.2.0 Kjemisk analyse.....	21
3.3.0 Beregninger og Statistisk analyse.....	21
3.3.1 Daisy ^{II}	21
3.3.2 iGP.....	22
3.3.3 <i>In sacco</i>	23
3.3.4 <i>In vivo</i>	24
3.3.5 Statistisk analyse.....	24
4.0 Resultater.....	25
4.1.0 Kjemisk sammensetning i fôrvarer.....	25
4.1.1 Daisy ^{II}	27
4.1.2 iGP.....	28
4.1.3 <i>In sacco</i>	31
4.1.4 <i>In vivo</i>	33
4.2.0 Sammenligning mellom metodene.....	33
4.2.1 Daisy ^{II} - iGP.....	33

4.2.2 Daisy ^{II} - <i>In sacco</i>	36
4.2.3 iGP - <i>in sacco</i>	39
4.2.4 <i>In vivo</i> - Daisy ^{II}	41
4.2.5 <i>In vivo</i> - iGP	42
4.2.7 Prediksjon av <i>in sacco</i> og <i>in vivo</i> parametere.....	45
5.0 Diskusjon.....	46
5.1 Sammenligning av metodene	48
6.0 Konklusjon	52
7.0 Referanser.....	53

1.0 Introduksjon og mål for oppgaven

Grovfôrproduksjonen har dype tradisjoner og har bidratt til verdiskapning som har formet det landbruket vi ser i dag. Kvaliteten av grovfôret vi fôrer dyrene våre med er av stor betydning for produksjon, dyrehelse, økonomi og miljø. I Norge er det viktig å ha nok fôr til dyrene gjennom vintersesongen. Tidligere ble dette gjort ved å konservere fôret ved tørking til høy. De siste generasjonene har bruken av surfôrets vokst og er tilnærmet enerådende som metode for å konservere grovfôr med høy kvalitet.

Karakterisering av surfôr for å kunne si noe om fordøyelighet og fôrverdi er viktig for å kunne maksimere dyrevelferd og økonomi i produksjonen. Den mest presise metoden for dette er forsøk på levende dyr (*in vivo*) for å undersøke hvor mye næringsstoffer som blir fordøyd. Denne metoden er nøyaktig, men svært kostbar og tidkrevende. Det finnes imidlertid alternative metoder for å undersøke fordøyelighet som er mindre kostbar og tidkrevende. ANKOM Daisy^{II}, *in vitro* gassproduksjon (iGP) og *in sacco* er alle metoder som er velprøvde (Chaudhry & Mohamed, 2011; Cornou et al., 2013; Kelley et al., 2016; Madsen et al., 1994; Michalet-Doreau & Ould-Bah, 1992). Det er likevel behov for å undersøke om disse metodene samsvarer med *in vivo* forsøk og med hverandre. I tillegg er det et stort behov for standardisering av de ulike metodene for å enklere kunne sammenligne på tvers av laboratorier. *In sacco* metoden er i likhet med *in vivo* metoden i stor grad avhengig av tilgang på forsøksdyr, mens Daisy^{II} og iGP er det i mindre grad.

Målet for denne masteroppgaven er å undersøke hvor godt egnet Daisy^{II}, iGP og *in sacco* er til å erstatte *in vivo* fordøyelighetsforsøk med sau til fastsetting av næringsverdi på surfôr til drøvtyggere. Dette skal gjøres ved å undersøke korrelasjoner mellom (1) Daisy^{II}, (2) iGP (3) *In sacco* og (4) *in vivo* fordøyelighetsforsøk som metoder for å bestemme fordøyelighet hos drøvtyggere. Forventingen til forsøket er at *in vitro* metodene og *in sacco* metoden skal korrelere godt med *in vivo* fordøyelighetsforsøk med sau, og at forskjellen mellom metoder skal være liten.

2.0 Bakgrunn og teori

2.1.0 Grovfôr

Fôrmidler som faller under begrepet grovfôr er typisk surfôr, halm, gras, høy og annen helgrøde. Grovfôr er imidlertid et tvetydig begrep og omhandler også vekster som potet og andre knollvekster (Harstad, 2016). Typisk for grovfôr er at det er tungt fordøyelig og har et høyt innhold av celleveggstoffer. Hovedbestanddelen av celleveggstoffene betegnes som NDF (Neutral detergent fiber) etter analysemetoden etter Van Soest (1967), og består av cellulose, hemicellulose og pektin (McDonald, 2010). I tillegg inneholder grovfôrplantene celleinnhold. Celleinnholdet er høyt, særlig i unge planter og utgjør komponenter som proteiner, fettsyrer, organiske syrer, stivelse og sukker. Celleinnholdet er den delen av planten som er mest tilgjengelig og fordøyes normalt kjapt og nesten fullstendig (Collins & Fritx, 2003).

Grovfôr kan konserveres på mange måter. Tradisjonelt har det vært gjort ved tørking, men i dag er ensilering med eller uten tilsetning av syre mest vanlig. Tilsetning av melkesyrebakteriekulturer (inokulant) er også blitt mer populært å bruke.

Ensileringsprosessen fremmer formeringen av melkesyrebakterier som under anaerobe forhold produserer melkesyre fra sukker i graset. Melkesyren konserverer fôret, og regnes å være godt smakelig for husdyra. Under fermenteringen etter høstingen blir noe av proteinet påvirket i form av det blir omdannet til ikke protein forbindelser som ammoniakk, amider og nitrater (NPN) (Petit & Tremblay, 2007). Andelen tørrstoff i graset ved starten av ensileringsprosessen er viktig for sluttproduktet. Gras med lavt tørrstoff inneholder generelt mer lett tilgjengelig karbohydrater og protein enn gras med høyt tørrstoffinnhold (Harstad, 2016). Dette vil ha betydning for hvor mye substrat mikrobene i siloen har tilgjengelig. Generelt vil mer substrat tilgjengelig gi økt fermentering, noe som kan redusere fôr kvaliteten ved at en mindre andel av næringsstoffene blir tilgjengelig for dyra, i tillegg til at økt innhold av organiske syrer kan redusere smakeligheten. Tørrstoffprosenten bør helst være over 25 %, da melkesyrebakterien tåler bedre høyt osmotisk trykk sammenlignet med de andre bakteriene som er i gresset, i tillegg vil økt tørrstoffinnhold redusere tapene av næringsstoffer i pressaft (Harstad, 2016; Volden et al., 2002).

2.1.1 Graset morfologi

Gras utgjør hoveddelen av fôret til en drøvtygger. Innholdet varierer betydelig, men består som regel av 80 % karbohydrater, 10-15 % proteiner og nukleinsyrer, 2-5 % fett og 5-7 % mineraler (MacAdam & Nelson, 2003). Grasartene kan være ettårig eller flerårig, og det er

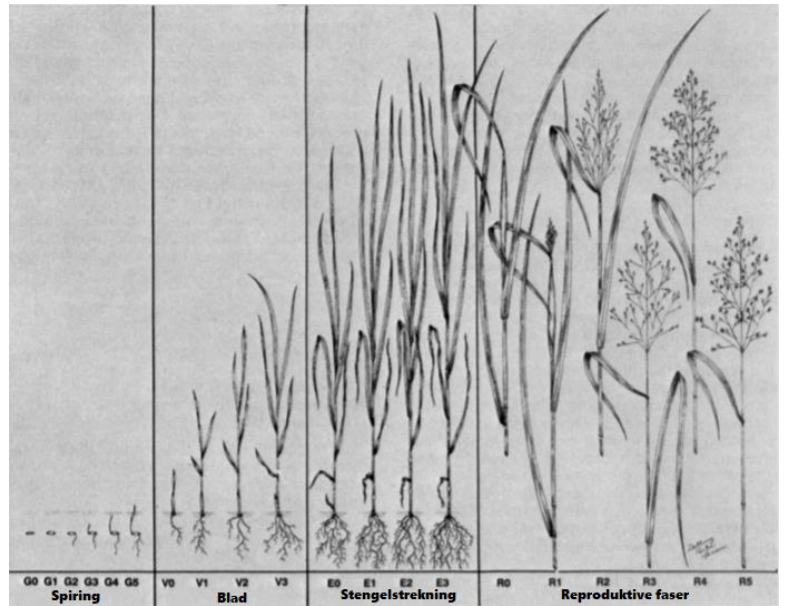
vanlig å skille mellom gras som vokser under varmere klima og kjøligere klima. Gras som vokser i kjøligere klima er såkalte C3 planter og danner 3-fosfoglyserol som første produkt i fotosyntesen (Sunding, 2020), mens planter under varmere forhold er C4 planter og danner oksaleddiksyre som første produkt i fotosyntesen (Sunding, 2013). Den viktigste forskjellen mellom disse to plantetyperne er at C3 plantene har fotorespirasjon, mens det hos C4 planten ikke er fotorespirasjon.

De viktigste grasartene i Norge er: timotei (*pheleum pratense*), engsvingel (*festuca pratensis*) og rødkløver (*trifolium pratense*), men også flerårig raigras (*Lolium perenne*), bladfaks (*Bromus inermis* Leyss), engrapp (*Poa pratensis* L.), hundegras (*Dactylis glomerata*) og enkvein (*Agrostis capilaris*) er arter som finnes rundt omkring. Flerårig raigras er mindre vinterherdig enn de andre nevnte, og tåler vårfrøst og isdekke dårlig og er dermed mest vanlig å finne på steder med milde vintre.

Bladene hos de typiske grasartene er parallelle og smale. Bladene er festet i strået/stammen, som har som oppgave å holde planten oppreist. Dette er med på å gjøre det lettere for planten å absorbere lys, og det gir enklere forhold for gass- og vannutveksling.

Fôr kvalitet kan defineres som den fysiske og kjemiske karakteristikken av ett fôr som gjør det tilgjengelig som en kilde for næring og velferd hos dyr (Balasko, 2003). Fôr kvaliteten kan variere betydelig ut fra flere forhold. For selve planten er utviklingstrinn hos de ulike grasartene spesielt viktig med hensyn på fôr kvaliteten til planten. Det er vanlig å beskrive utviklingstrinn hos fôrplanter i kvantitative former, som f.eks. tetthet og lengde, eller i forhold til reprodutiv utvikling av planten (Mooser & C.J., 2003). Et eksempel på de reprodutive fasene er vist i Figur 1. Det er hovedsakelig seks steg å forholder seg til: (1) det vegetative stadiet hvor blader vokser opp fra frøet, (2) stengelstrekningfasen der minst ett nodium er synlig på minst 50 % av planten, (3) start skyting der en liten del av akset kommer til syne, (4) skyting der minst halve akset er synlig over flaggbladet, (5) full skyting der det aksbærende strået kommer til syne, (6) blomstring der støvbærerne kommer til syne (Moore et al., 1991).

Etter hvert som graset utvikler seg vil forholdet mellom blad og stilk reduseres slik at det blir mer stilk i forhold til blad. Stilkfraksjonen har en sterkere struktur enn bladfraksjonen. Årsaken til det er på grunn av lignifisering av karbohydratene, noe som gjør at graset blir mindre fordøyelig. Lignin er ikke et karbohydrat, men er en polymer som ses i sammenheng med karbohydrater (Sjaastad et al., 2016). Lignin er med på å gi ekstra støtte, og særlig i det



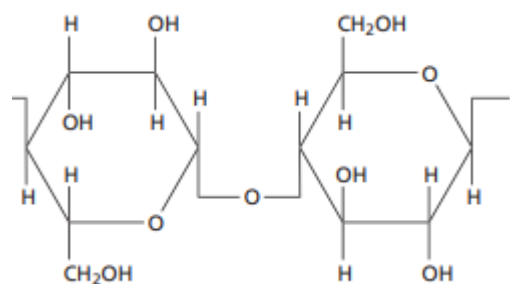
Figur 1. Illustrasjon av gressets utviklingstrinn, fra spiring til blomstring (Moore et al., 1991)

vaskulære ledningsvevet hos planter (UiO, 2011b). I tillegg er alle plantecellene omgitt av en primær cellevegg som har et høyt innhold av cellulose, hemicellulose og pektin, og en sekundær cellevegg som fungerer som styrkevev og stort sett inneholder cellulose og lignin (UiO, 2011a). Disse fibercellene blir også kalt sklerenkymceller hvor lignin fungerer som bindingsledd som gir øket styrke og beskyttelse mot fremmedlegemer (UiO, 2011b). Den primære celleveggen er tynn og ligger ytterst på cellen, mens den sekundære celleveggen er noe tykkere og ligger på innsiden av den primære celleveggen.

2.1.2 Hovednæringsstoffene i fôr

Karbohydrater kan deles inn i to grupper: strukturelle og ikke-strukturelle (Volden, 2011). Hos de strukturelle karbohydratene utgjør NDF hovedfraksjonen. Denne kan videre deles inn i potensiell fordøyelig- (pdNDF) og ufordøyelig fraksjon (iNDF). Sukkermolekylene i NDF består hovedsakelig av beta-1,4-bindinger og er med på å danne cellulose og hemicellulose (Figur 2).

Stivelse sammen med fruktaner og andre løselige karbohydrat utgjør de ikke-strukturelle karbohydratene. Innholdet av stivelse i grovfôr er lavt, mens stivelse er hovedbestanddelen i korn. Stivelse består av de to polysakkarider amylose og amylopektin. Andelen av disse polysakkaridene varierer mellom stivelsekilder, men amylopektin



Figur 2. To glukose molekyler fra cellulose bundet sammen med β -1,4-Binding (McDonald, 2010)

utgjør normalt 70-80 % av den totale mengden stivelse (McDonald, 2010). I amylose og amylopektin er glukose bundet med α -(1:4) og α -(1:6) bindinger, som er nedbrytbar også for dyrets egne fordøyelsesenzymer.

Proteiner er komplekse organiske komponenter, og i tillegg til karbon, hydrogen og oksygen, også består av nitrogen og som regel svovel (McDonald, 2010). Proteinene i fôret kategoriseres i to fraksjoner; (1) reinprotein og (2) NPN. Reinprotein er bygget opp av aminosyrer som består av en aminogruppe (NH_2), en karboksyl gruppe (COOH) og en sidegruppe (R). Denne sidegruppa er unik for hver aminosyre. Gjennomsnittlig inneholder protein 16 % nitrogen, og på denne måten kan innholdet av råprotein i en fôrprøve relativt lett beregnes ved å multiplisere nitrogeninnholdet med 6.25. Nitrogeninnholdet blir normalt bestemt gjennom kjemisk analyse (*Kjedahl-N*), eller ved forbrenning (*Dumas metode*). Nedbrytningsgraden av protein i fôrvaren varierer stor mellom ulike typer fôr, og forskjellige kjemiske og fysiske faktorer er med på påvirke nedbrytningsgraden (Da Silva et al., 1972).

Gras inneholder relativt lite fett og mengden fett i drøvtyggerrasjonen er som regel lavere enn 5 % (Sjaastad et al., 2016). Fett i kraftfôr holdes også relativt lavt på grunn av at frie fettsyrer i vomma har en tendens til å feste seg til fôrpartikler, særlig fiber, og hindrer normal fermentering (Wattiaux, 1999). Likevel er fett en viktig del av drøvtyggerens diett, da omtrent 50 % av fettene absorberes i tarm benyttes direkte til fett i melke (Wattiaux, 1999). Fett i fôr til drøvtyggere er som regel triglyserider (kraftfôr) og frie fettsyrer og galaktoglyserider (gras) der α -linolensyre og linolsyre utgjør omtrent $\frac{3}{4}$ av fettsyrene (Elgersma et al., 2003).

2.1.3 Drøvtyggerens fordøyelsesfysiologi

Hovedelementene i fordøyelsessystemet hos en drøvtygger er den samme som hos enmaga dyr. I tillegg har drøvtyggere formagene som fysiologisk er utposninger på spiserøret før selve magesekken, som hos drøvtyggere kalles løypen. Løypen har de samme egenskapene som magen hos enmagede dyr, hvor det blant annet det skilles ut saltsyre og det proteinspaltende enzymet pepsin (Sjaastad et al., 2016). De tre formagene er vomma, nettmagen og bladmagen, hvor vomma utgjør hoveddelen sammen med nettmagen. Formagene produserer ingen fordøyelsesenzymer selv slik som løypen, men inneholder imidlertid store mengder mikrober som lever og formerer seg i et anaerobt miljø. Disse mikroberne produserer enzymer som er i stand til å bryte ned fiberrikt materiale (Sjaastad et al., 2016). Dette skjer i fravær av oksygen og kalles fermentering.

Det finnes mange grupper bakterier i formagene, men hovedsakelig forekommer tre: amylytiske-, cellulolytiske- og proteolytiske bakterier. Av disse er de cellulolytiske spesielt viktige da enzymer fra dem er i stand til å bryte ned kjemiske bindinger som dyrets egne enzymer ikke har mulighet til å bryte ned, slik som β -bindingene i NDF (Sjaastad et al., 2016). Mye av energien i planten er bundet her og nedbrytning av disse bindingene er viktig for utnyttning av fôret. I forhold til enzymatisk nedbrytning av stivelse og protein er mikrobiell fermentering av cellulose tidkrevende, og fôr med høyt innhold av fiber trenger relativt lang oppholdstid i formagene for å bli fordøyd.

2.1.4 Omsetning i vom

Den mikrobielle nedbrytning av karbohydrater foregår i første fase ekstracellulært, hvor cellulose, hemicellulose, pektiner, stivelse og andre løselige sukker blir hydrolysert til heksoser og pentoser. Disse substratene er ikke tilgjengelig for drøvtyggeren da disse transporteres inn i mikrobe. Inne i mikrobe blir hovedandelen av pentosen omdannet til heksoser. Heksose går dermed inn i Embden-Meyerhof-Parnas-stoffskiftevei (glykolysen) og som i andre celler blir et molekyl heksose til to molekyler pyruvat (France & Dijkstra, 2005). Pyruvat blir videre omdannet til flyktige fettsyrer som er endeproduktet etter mikrobiell omsetning (Sjaastad et al., 2016).

Stort sett alle karbohydrater blir fordøyd og brutt ned i vom og mengden glukose absorbert i tarm vil dermed være veldig lav. Glukose er et viktig substrat til dannelsen av melkesukker (laktose), i tillegg til at det spiller en viktig rolle i hjerne- og nerveceller. På grunn av lav tilgangen av glukose er substrater til glukoneogenesen viktig for å kunne tilfredsstille behovet for glukose. Propionsyre er drøvtyggerens viktigste kilde i glukoneogenesen, etterfulgt av glukogene aminosyrer og laktat som også bidrar i glukoneogenesen for produksjon av glukose (Sjaastad et al., 2016). I tillegg kan glukosestatus bedres ved å benytte stivelse som ikke fordøyes fullstendig i vom, som f.eks. maisstivelse (Tothi et al., 2003).

Omsetning av fôrprotein hos en drøvtygger kan deles i to grupper: det som blir brutt ned i vom og det som passerer unedbrutt. Det som blir brutt ned i vom blir utsatt for mikrobiell nedbrytning og starter ekstracellulært. Den ekstracellulære nedbrytningen resulterer i at proteolytiske enzymer bryter ned proteinene til peptider og aminosyrer. Peptidene og aminosyrene transporteres deretter inn i mikrobe hvor aminosyrene kan utnyttes direkte til mikrobiell vekst, eller bli deaminert med dannelse av flyktige fettsyrer, organiske syrer og ammoniak som sluttprodukt (Sjaastad et al., 2016). Ammoniakken kan sammen med karbonskjelettet fra deamineringen av aminosyrer bli brukt til å bygge opp nye aminosyrer og

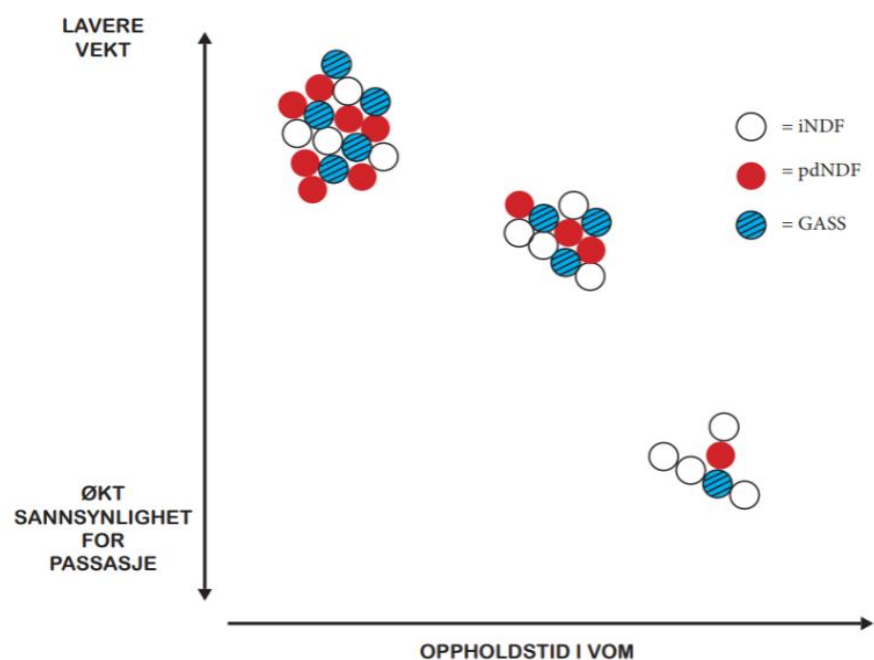
dermed mikrobeprotein. Hvor stor andel av fôrprotein som blir omsatt i vom påvirkes av flere ting, men hovedsakelig hvor lettøselig fôrprotein er og hvor høy passasjehastighet det er i vomma (Prestløkken, 1994).

På grunn av kontinuerlig transport av innhold fra formagene og videre ut til tarm vil noe protein kunne passere uten å bli nedbrutt av mikrobene f.eks. korn-protein et zein og varmebehandlet protein og kalles for ikke nedbrytbart fôrprotein (INP) (Maxin et al., 2013). Denne direkte passeringen kan både være gunstig og ugunstig. Den er gunstig hvis aminosyresammensetningen er til fordel for dyret selv, da den blir ivaretatt og absorbert i tynntarmen i stedet for å bli brutt ned av mikrobene. Dette kan også være ugunstig da ufordøyelig protein i vom kan være ufordøyelig i tarm også, og vil dermed kunne passere uten å bli utnyttet.

Fettfordøyelsen i vom starter ved hydrolysering av tri- og galgatoglyserider til glyserol, frie fettsyrer og galaktose. Glyserol og galaktose blir fermentert av mikrobene som karbohydrater. De frie umetta fettsyrene gjennomgår en hydrogenering slik at majoriteten blir mettet. Dette betyr at de fleste fettsyrene som forlater vommen og blir absorbert i tynntarmen i stor grad er enten palmitinsyre (C16:0) eller stearinsyre (C18:0) (Adler et al., 2011).

Fordøyeligheten av fiber i vom er tidsavhengig og betegnet som en “alders-avhengig” prosess (Prestløkken et al., 2011). Fiber blir selektivt tilbakeholdt og reduserer passasjehastighet fra vom. Dette skjer under fermenteringen når mikrober har festet seg til fiberpartiklene. Når

fermenteringen starter, begynner produksjonen av gass. Gassen fører til at fiberpartiklene “flyter” opp, og blir liggende høyt i vomma og dermed ikke i posisjon til å forlate vomma. Etterhvert vil den delen av partiklene som er fordøyelig forsvinne, og fermenteringen avtar. Dette fører til at partikkelen synker, og vil komme i posisjon til å forlate vomma. Denne prosessen er illustrert i Figur 3. Den øvrige andelen av fôret er regnet å følge en alders-uavhengig passasje fra vom



Figur 3. Illustrasjon av “alders-avhengig” nedbrytning, modifisert fra Allen (1996)

der alle partikler har lik sannsynlighet for å bli fordøyd eller forlate vomma (Prestløkken et al., 2011).

Ved ideelle egenskaper vil fordøyeligheten i vom bestemmes på bakgrunn av passasjehastighet (andel passert ut fra vom per time = k_p) og nedbrytningshastighet (andel brutt ned i vom per time = k_d) (Volden, H & Larsen, M, 2011). Er disse to verdiene kjent kan fordøyelighet i vom beregnes som (Formel 1) (Prestløkken et al., 2011):

$$\text{Fordøyelighet} = \frac{k_d}{k_d + k_p} * 100 \quad [1]$$

Nedbrytningshastigheten (k_d) påvirkes i stor grad av innholdet av tungtfordøyelige celleveggstoffer, men også av partikkelstørrelse (snittelengde av gras og malingsgrad av kraftfôr), tørrstoffinnhold, kjemisk sammensetning og tyggeaktivitet av dyret selv. For å kunne passere fra vom må partiklene under en viss størrelse. Nøyaktig partikkelstørrelse er omdiskutert, men størrelse på 1-2 mm er oppgitt for sau (Poppi et al., 1980) og 2-4 mm for storfe (Cardoza & Mertens, 1986). Fôr med rask nedbrytningshastighet vil ha lav fyllverdi i vomma, og dermed kan høyere fôropptak oppnås (Harstad, 2018). Det er også andre forhold som påvirker fôropptaket: hold, dager før/etter kalving, dyrets størrelse og smakelighet. Graden av passasje bestemmer hvor lenge fôret oppholder seg i vomma, og dermed også tiden hvor den potensielle nedbrytningen finner sted. Videre påvirkes passasjehastigheten av gjennomsnittlig grovfôr- og kraftfôrnivå i dietten (Volden et al., 2002).

De viktigste sluttproduktene fra mikrobenes fermentering i vomma er: eddiksyre, propionsyre, smørsyre melkesyre, ravsyre, metanol, etanol, karbondioksid (CO_2), H_2 og metan (CH_3), samt varme (McDonald, 2010; Theodorou & France, 2006). Eddiksyre, propionsyre og smørsyre står for 95 % av VFA produsert, resterende er hovedsakelig valerinsyre, kapronsyre, iso-smørsyre, iso-valerinsyre og andre sporer (France & Dijkstra, 2005; Sjaastad et al., 2016). VFA er drøvtyggerens viktigste kilde til energi (Wattiaux, 1994) og den relative andelen mellom de ulike flyktige fettsyrene spiller en viktig rolle for drøvtyggerens metabolisme (Sjaastad et al., 2016). Forholdet mellom de ulike flyktige fettsyrene varierer med rasjonssammensetningen. En stivelsesrik rasjon vil være med på å øke den totale mengden flyktige fettsyrer produsert, samt økt andel propionsyre sammenlignet med en diet med rik på fiber som gir høy andel eddiksyre (Sjaastad et al., 2016). Energien som blir produsert under fermenteringen er i form av ATP (adenosintrifosfat), som blir brukt til mikrobiell vekst og utvikling.

De flyktige fettsyrene som mikrobenes produserer, blir deponert i vomvæsken hvor de er med på å påvirke pH i vomma. Vommiljøet spiller en viktig rolle for fordøyeligheten av fôret. Rask økning av VFA kan forårsakes av høyt inntak av kraftfôr, og vil føre til at store mengder VFA blir produsert i vom i løpet av kort tid. Dette fører til at pH i vomma synker og kan bli drastisk lav. Normal pH i vom er 6.0 – 6.8 og lavere pH enn dette kan medføre sur vom (Sjaastad et al., 2016). Vomacidose forekommer når pH blir lavere enn 5.5, og er en tilstand som blant annet kan skade vomepitelet (Sjaastad et al., 2016). De ulike bakteriene har ulik toleranse for pH. Cellulolytiske bakterier er de som er mest følsomme hvor gunstig pH nivå er mellom 6.2 – 6.8, mens de amylolytiske bakteriene tåler noe lavere pH (Volden, 2020). Lav pH i vom kan derfor medføre redusert tørrstoffopptak og redusert fiberfordøyelighet. Årsaken til at de amylolytiske bakteriene tåler noe lavere pH enn de cellulolytiske er at de har ionepumper som pumper H^+ - ionene ut fra cellen når konsentrasjonsgradienten blir for høy, mens de cellulolytiske bakteriene kun har passiv diffusjon som derimot vil føre til akkumulering av H^+ - ioner intermediært og cellene dør (Russell & Strobel, 2006).

Vomma har hovedsakelig to funksjoner som regulerer pH: (1) de flyktige fettsyrene blir absorbert over vomepitelet til blodet hvor det videre blir transportert til leveren og (2) spyttet som blir produsert inneholder bikarbonat (HCO_3^-) som fungerer som en buffer for vommiljøet. Ved absorpsjon av VFA fra vom over til blod foregår det en passiv kotransport hvor HCO_3^- blir byttet mot VFA som også er med på å bufre vomma (Sjaastad et al., 2016). Smørsyren blir omsatt til beta-hydroxysmørsyre, propionsyren blir til en viss grad omsatt til mjølkesyre i vomepitelet mens eddiksyre passerer uforandret (Kristensen, 2003; Sjaastad et al., 2016).

2.1.5 Fôrmiddelvurdering

Fôrmiddelvurdering handler om hvordan næringsstoffene i fôret omsettes i fordøyelseskanalen og hvordan de ulike absorberte substratene blir omsatt og utnyttet intermediært. Næringsverdien til fôret er i hovedsak bestemmes av konsentrasjonen av næringsstoffer og fordøyeligheten av dem, mens den intermediære omsetningen og utnyttningen reflekterer dyrets næringsbehov. I så måte er dyrenes næringsbehov og fôrets næringsverdi et speilbilde av hverandre.

I formiddelvurdering er det som regel snakk om energetisk næringsverdi og stofflig næringsverdi der protein er viktigst (Harstad, 1994). Både for energi og proteinverdi er fordøyelighet i vom viktig. Energi er lagret i fôret som kjemisk energi. Energiverdien er gruppert i ulike energiformer og energitap: brutto energi (BE), fordøyelig energi (FE),

omsettelig energi (OM) og nettoenergi (NET) (McDonald, 2010). Hver av energigrupperingene blir i nevnt rekkefølge mer presis, og eliminerer den delen av energien i fôret som ikke kan utnyttes av dyret selv.

BE er den totale energien som er kjemisk lagret i fôret, og bestemmes ved fullstendig forbrenning i bombekalorimeter. Mengden varme fra en komplett forbrenning av en enhet fôr er den totale mengde BE (Harstad, 1994; McDonald, 2010). BE varierer i liten grad mellom ulike grasarter da de hovedsakelig består av karbohydrater som står for ca. 85 % av BE fordøyd av en drøvtygger (Sjaastad et al., 2016) og ligger omtrent på 17.5 MJ/kg TS (McDonald, 2010). Fôrvarer som skiller seg er oljefrøplanter som har et høyt innhold av fett og vil normalt inneholde høyere andel BE og planter som inneholder mye aske og vil normalt inneholde lavere andel BE.

FE representerer den andelen av energien som blir absorbert. Apparent-FE blir beregnet ved å subtrahere BE i gjødsel fra BE-innholdet av fôr spist (McDonald, 2010). Energi tapt i gjødsel er den tapsposten som varierer mest, og kan variere fra 10-60 % (Harstad, 1994). Dette skyldes i all hovedsak fordøyeligheten til fôrvaren som er med på å påvirke oppholdstiden i vom.

OM omhandler den energien som er tilgjengelig etter energi i urin og fermenteringsgasser er subtrahert fra FE. OM representerer den andelen energi som er tilgjengelig for dyret, og nyttes til vedlikehold og produksjon. Energiholdige komponenter i urinen er urea, hippursyre, kreatin og allanoin (2-8 %), i gassform er det hovedsakelig metan produsert i vom og i baktarm som står for mesteparten (11 - 13 %) (McDonald, 2010). Den mikrobielle fermenteringen fører til et overskudd av hydrogen, dette overskuddet benyttes hovedsakelig av metanogene bakterier som produserer metan gass (CH_3). Gassen skilles hovedsakelig ut i form av raping og en del absorberes i blod og utåndet via lungene (>90%), resten kommer ut fra endetarmen (<10%).

Ved videre omsetning av fôret oppstår tap i form av varme, dermed vil ikke all OM komme til nytte. OM minus termisk tap omtales som NE (Gjefsen, 2016). Energi til vedlikehold er hovedsakelig benyttet til å utføre en form for arbeid, f.eks. tygging og tarmkontraksjoner (peristaltiske bevegelser), fermenteringsvarme, absorpsjon av næringssubstrater, og vil forlate dyret i form av varme. Til produksjon er det som regel i form av avleiring av energi til melk, ull, egg og kjøtt (Harstad, 1994; McDonald, 2010). Tap i form av termisk energi er relativt stor, og kan være så høy som 20-30 % av BE (Harstad, 1994). Det er i NE-beregningene

korrigert for nedgang i fordøyeligheten ved økt fôropptak med en korrigeringsfaktor som sørger for en lavere potensiell utnyttelse av den tilgjengelige energien (Ekern, 1993).

Protein evalueringssystemet som benyttes i Norge er AAT/PBV- systemet, og er et konsept som i all hovedsak handler om AAT (Aminosyrer Absorbent i Tarm) og PBV (Protein Balansen i Vom). Disse to beregnede faktorene tar hensyn til omsetningen av protein i vomma, og i selve organismen (Madsen et al., 1995). AAT kommer hovedsakelig fra: INF, mikrobielt protein produsert i vom og endogent protein (Volden, H. & Larsen, M, 2011). PBV beskriver samspillet mellom tilgjengelig energi og nitrogen i vom. Negativ PBV indikerer at nitrogen er den begrensende faktor, mens positiv PBV indikerer at det er overskudd av nitrogen. Dermed kan man sørge for best mulig balanse mellom nitrogen og energi. Faktorer som inngår i AAT/PBV-systemet er: (1) den effektive nedbrytningsgraden av fôrprotein i vom, som bestemmes av *in sacco* metoden og beregnes med en kalkulert passasjehastighet på 8 %/t, (2) andel mikrobielt protein i vom som bestemmes fra andelen fordøyelige karbohydrater i rasjonen og (3) konstante verdier for aminosyreinnholdet i mikrobielt protein (70 %), fordøyeligheten av mikrobielle aminosyrer (85 %), aminosyreinnhold fra INF i grovfôr (65 %) og aminosyreinnhold i INF i kraftfôr (85 %) (Harstad, 1994; Madsen et al., 1995).

2.2.0 *In vivo* fordøyelighet

På latin betyr *in vivo* 'i det levende', og er et uttrykk på undersøkelser som gjøres i levende organismer. Formålet med *in vivo* fordøyelseforsøk er å måle hvor stor andel av fôret som går inn i dyret som faktisk blir absorbert og omsatt intermediært (apparent fordøyelighet). *In vivo* fordøyelighetsforsøk krever store mengder fôr og er tidkrevende som medfører at metoden er svært kostbart (Kitessa et al., 1999). *In vivo* anses som den mest nøyaktige måten å bestemme fordøyelighet og anses som referansemotoden for fordøyelighetsforsøk..

De mest brukte metodene for å finne *in vivo* fordøyelighet er fullstendig oppsamling av gjødsel, urin og fôr, markørmetoden og vomtømmingsmetoden. Markørmetoden går ut på å enten benytte seg av en ekstern markør som ikke finnes i fôret, f.eks. Cr-EDTA og Yb-acertat. En kan også benytte seg av interne markører som allerede finnes i fôret, f.eks. iNDF. Det er ulike krav til en markør som bør være utfyllt: (i) ufordøyelig, (ii) den skal ikke påvirke fordøyelsessystemet på noen måte, ei dens mikrobielle aktivitet, (iii) den må oppføre seg på samme måte som det den skal måle og (iv) ha en klar og sikker analyse (Faichney, 1975). Markørmetoden gjør det mulig å måle fordøyeligheten i ulike deler av fordøyelsessystemet, og i gjødsel uten å gjøre kvantitativ oppsamling, og gir grunnlag for å kunne beregne

passasjehastighet og nedbrytningshastighet. Det er ingen markører som egner seg til å måle alle slags faser, det er dermed vanlig å bruke flere markører samtidig for å få et større nedslagsfelt for undersøkelsene. Ved vomtømmingsmetoden forutsettes det første ordens kinetikk (Krizsan et al., 2010). Men ved å anta dette for NDF medfører dette en begrensning ved metoden, da antagelsen om første ordens kinetikk ikke gjelder for NDF (Stensig et al., 1998). Passasjehastigheten beregnes ut fra forholdet mellom det som passerer ut fra vomma (kg/time) og selve vominnholdet (vompool i kg) (Weisbjerg et al., 2003).

Ved *in vivo* forsøk er det ulike faktorer en må ta høyde for. Tap av energi til produksjon av metangass er en av disse faktorene. Tapet til metan fører til overestimering av den fordøyelige karbohydrat- og energifraksjonen (McDonald, 2010). Videre tas hensyn til endogent tap. Ikke all gjødsel inneholder fullstendig fordøyd materiale. Sekrementene kan inneholde enzymer og andre substanser som er ekstrahert i fordøyelsessystemet og som ikke blir fordøyd eller reabsorbert, i tillegg til at det kan inneholde avslitt cellemateriale fra innsiden av fordøyelseskanalen og mikrober fra baktarmsfermenteringen. Det blir også skilt ut en viss andel andre stoffer, slik som eter ekstrakt og mineraler, hovedsakelig kalsium (McDonald, 2010). Utskillelsen av stoffer i avføringen kan bestemmes ved fullstendig gjødsellopsamling, eller ved bruk av markørmetoder, der det benyttes en kjent mengde markør (Weisbjerg & Hvelplund, 2003)

2.2.1 *In sacco*

In sacco betyr i pose/bag, og er en metode utviklet av Mehrez og Ørskov (1977). Prinsippet er å benytte nylonposer med små porer, vanligvis 36 µm, som fylles med en fôrprøve hvorpå de inkuberes i vom (Mehrez & Ørskov, 1977). Porestørrelsen er tilpasset slik at mikrobene i vomma skal kunne vandre fritt gjennom posens porer, og at nedbrytningsproduktet etter fermentering fritt kan forlate posen, og unedbrutte fôrpartikler holdes tilbake (Weisbjerg & Hvelplund, 2003). Posene inkuberes for ulike tidsintervaller (0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 timer osv.) og hensikten er å finne en nedbrytningsprofil til de forskjellige fôrprøvene. Denne nedbrytningsprofilen følger en eksponentiell funksjon og kan benyttes til å bestemme fordøyelighet i vom (Ørskov & McDonald, 1979). Etter inkubering i vom blir posene umiddelbart rensset med kaldt springvann for å stoppe all mikrobiell aktivitet. Deretter vaskes posene med innhold i en kommersiell vaskemaskin med kaldt vann og uten sentrifugering. Det benyttes som regel 2-4 kyr i et fullstendig radomisert forsøksopplegg, hvor hver ku fungerer som replikanter (Petit & Tremblay, 2007). Etter inkubasjon analyseres reststoffet og ut fra denne informasjon kan nedbrytningsprofilen finnes. Mobile nylonposer er en metode

som benyttes for å finne nedbrytningsgraden i tarm. Metoden bygger på samme prinsipp som *in sacco* i vom. De mobile nylonposene skal deponeres i tolvfingertarmen (duodeum). Ved tilgang på tarmfistulerte dyr både i duodenum og ileum (slutten av tynntarmen) kan nylonposene tas ut i ileum før den når endetarmen, og på denne måten unngå kontaminering av mikrobiell aktivitet i endetarmen. Hovedformålet for mobile nylonposer i tarm er å finne nedbrytningsgraden av protein og stivelse i tarm.

Det er enkelte elementer ved *in sacco* metoden som kan være med på å skape stor variasjon innen og mellom ulike forsøk, og er med på å svekke metoden. Nozière og Michalet-Doreau (2000) fremmer noen problemer med metoden: mikrobiell kontaminering av posene ved analysering, fôrprøvene blir ikke utsatt for drøvtygging, porestørrelsene kan føre til utvasking av partikler fra fôrprøvene, f.eks. nitrogen kan gå tapt, samt annen partikkeltap som vil føre til overestimering av nedbrytningen. Metoden tar heller ikke høyde for den selektive tilbakeholdelsen av større partikler i vom, og vil dermed kunne overestimere nedbrytningen av NDF.

2.2.2 *In vitro* fordøyelighet

In vitro betyr på latin «i glass» og er forsøk som foregår utenfor den levende organismen. Det er visse kriterier som må oppfylles for å utvikle en metode som er egnet. Metoden burde være nøyaktig nok til at resultatet korrelerer en viss grad med den virkelige biologiske responsen som bestemmes av *in vivo* forsøk (Nocek, 1988). Metoden burde også være presis når det gjelder å gjennomføre forsøket på samme måte både innen og blant andre laboratorier. *In vitro* metoder bør være mindre tidskrevende og billigere å gjennomføre enn et *in vivo* forsøk (Nocek, 1988). Det finnes forskjellige metoder for å undersøke *in vitro* fordøyelighet. De fleste av dem baserer seg på å benytte en bufferløsning sammen med enzymer eller mikrober (Weisbjerg & Hvelplund, 2003). Bufferløsningen spiller en viktig rolle for å holde en stabil pH i løsningen, og for tilførsel av nitrogen og andre næringsstoffer til mikrobiell vekst og utvikling (Marten & Barnes, 1979). Vomvæsken er en stor kilde til variasjon når det gjelder forsøk som inkluderer bruk av vomsaft fra levende dyr. Elementer som kan være med på å øke variasjonen er dietten, rase, alder, individ og mellom individer (Marten & Barnes, 1979).

Utviklingen for å finne den beste laboratoriemetoden for å undersøke fordøyelighet hos drøvtygger har pågått i mange år. Den første sikre metoden for å undersøke tørrstoff fordøyelighet ble introdusert av Tilley og Terry (1963) på 60-tallet, og har vist å ha høy korrelasjon med *in vivo* fordøyelighet (De Boever et al., 1988; Goldman et al., 1987).

Metoden går ut på å utsette fôrprøven for 48 timer inkubasjon i en mikrobiell væske bestående

av en buffer og vomvæske. Restene etter denne inkubasjonen blir utsatt for en pepsin-saltsyre løsning i 48 timer (Tilley & Terry, 1963). Ulike aktører har i ettertid vært med å utvikle metoden til å kunne ha et bredere bruksområde og for å bli mer presis i forhold til tørrstoffordøyelighet, men ikke mye er gjort for å effektivisere selve prosessen, mye på grunn av at metoden ikke tillater flere prøver i samme fordøyelsekammer (Holden, 1999). Årsaken til at lengden på inkubasjonstiden ofte er 48 timer er på grunn av at nedbrytningskurven har mer eller mindre flatet ut på dette tidspunktet. Andre *in vitro* metoder som eksisterer er Darcon polyesterpose teknikk, gassproduksjon, fermenterende enzymer, gel elektroforese, Daisy^{II} og nærinfrarød spektroskopi for å nevne de mest kjente (Stern et al., 1997).

Nedbrytningskurven for et *in vitro* nedbrytningssystem er som regel sigmoid (Marten & Barnes, 1979). Men i flere tilfeller (Grant et al., 1974; McLeod & Minson, 1969) hvor innholdet av NDF er høyt vil fullstendig fordøyelighet i løpet av 48 timer ikke være tilstrekkelig da kurven fremdeles er stigende. Dermed vil en forlengelse av inkubasjonstiden være nødvendig for å kunne estimere

fordøyeligheten til fôr med høyt innhold av NDF.

ANKOM Daisy^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA) er en metode som innebærer at opptil 25 forskjellige prøver holdes sammen i ett inkubasjonsglass på 2 liter. Glassene simulerer innsiden av vomma, og roterer for å sørge for omrøring. Til sammen er det plass til 4 slike inkubasjonsglass (Figur 4), dette gir rom til å ha 100 prøver samtidig. Ved inkubasjon holdes temperaturen stabil på 39.5°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) (ANKOM-Technology, 2017). ANKOM Daisy^{II} metoden baserer seg på filter bag metoden for å bestemme nedbrytningsgrad av ulike næringskomponenter. Effektiviteten til Daisy^{II} sammenlignet med Tilley og Terry metoden vil dermed være betraktelig høyere. Metoden har i flere forsøk (Damiran et al., 2008; Holden, 1999; Mabweesh et al., 2000) vist seg å korrelere bra med andre *in vitro* metoder.



Figur 4. Bilde av benyttet Daisy^{II} inkubator. Gjennom glasset på døra og inn til inkubasjonskammeret vises de fire inkubasjonsglassene. Foto Ole Berner Bondø

Den optimale prøvemengden er den mengden som sørger for at det blir nok prøve igjen etter forsøket til at analyse kan utføres, samtidig som at posene ikke fylles for mye, da dette kan være med på å forsinke eller forhindre mikrobeaktiviteten. ANKOM-Technology (2017) anbefaler selv en prøvemengde mellom 0.25 – 0.50 gram. En måte å ta hensyn til dette er å sammenligne posens overflate med mengde prøve for å kunne sammenligne på tvers av laboratorier (Nocek, 1988). Det kan gjøres med følgende formel:

$$\frac{\text{Prøve mengde (mg)}}{\text{Posens bredde (cm)} \cdot \text{posens lengde (cm)} \cdot 2} \quad (\text{Vanzant et al., 1998}).$$

Gassproduksjon er en metode som i forhold til mange andre metoder ikke spesifikt ser på mengden næringsstoffer som er igjen etter inkubasjonen. Gassproduksjonsmetoden går ut på å måle gass produsert ved fermentering hos vommikrobene under inkubasjonen (Wood & Badve, 2001). Gass kommer direkte fra den mikrobielle nedbrytningen av fôret, og indirekte fra buffereffekten av det syrlige produktene under fermenteringen (Getachew et al., 2004). Det er funnet høy korrelasjon mellom gassproduksjon og nedbrytningsgraden til NDF (Pell & Schofield, 1993). Et av problemene med gassproduksjonssystemet er at mengden gass produsert avhenger av fermenteringsmønsteret og produksjonen av VFA. For eksempel vil en fermentering som heller mot en høyere produksjon av propionsyre føre til en lavere produksjon av gass på grunn av at mer karbon blir nyttet til å danne propionsyre i forhold til eddiksyre (Wolin, 1960). Hovedsakelig under prosessen er det karbohydratene som er substrat for gassproduksjonen, da det ved fermentering av proteiner er lav produksjon, og fraværende for fett (Menke, 1988). Det er også forskjell mellom de tidligere metodene om gassen ble ventilert eller ikke. Pell og Schofield (1993) brukte en metode hvor gassen ikke blir ventilert. Dette er ugunstig da akkumulering av gass kan påvirke: (i) frigjøringen av gass fra den mikrobielle væsken (Tagliapietra et al., 2010; Theodorou et al., 1994), (ii) føre til en underestimert av gass målt og (iii) en andel av gassen kan ha blitt vannløselig å blandet seg med bufferen (Theodorou et al., 1998). ANKOM gassproduksjonssystem (ANKOM^{RF} Gas production System, Ankom Technology, NY, USA) er en metode som ventilerer gassen produsert underveis. Metoden kan ha opptil 50 glassbeholdere (250 ml) på en gang og er utstyrt med en trykksensor som er trådløs forbundet med en datamaskin (Figur 5) (Tagliapietra et al., 2010). Dette utstyret tillater hyppige trykkmålinger (ned til hvert minutt),

og har et ventileringssystem som sørger for lavt trykk inne i beholderen (6,9 kPa)(Cornou et al., 2013). Trykket som er målt i inkubasjonsglassene kan videre beregnes til produsert gass i milliliter som er med på å illustrere mengde gass produsert over et gitt tidsintervall. Ved undersøkelse av prøver med lavt innhold av celleveggstoffer er 48 timer som regel tilstrekkelig, men ved høyt innhold av celleveggstoffer er ikke 48 timer tilstrekkelig, og lengere tid benyttes for å oppnå fullstendig fermentering.

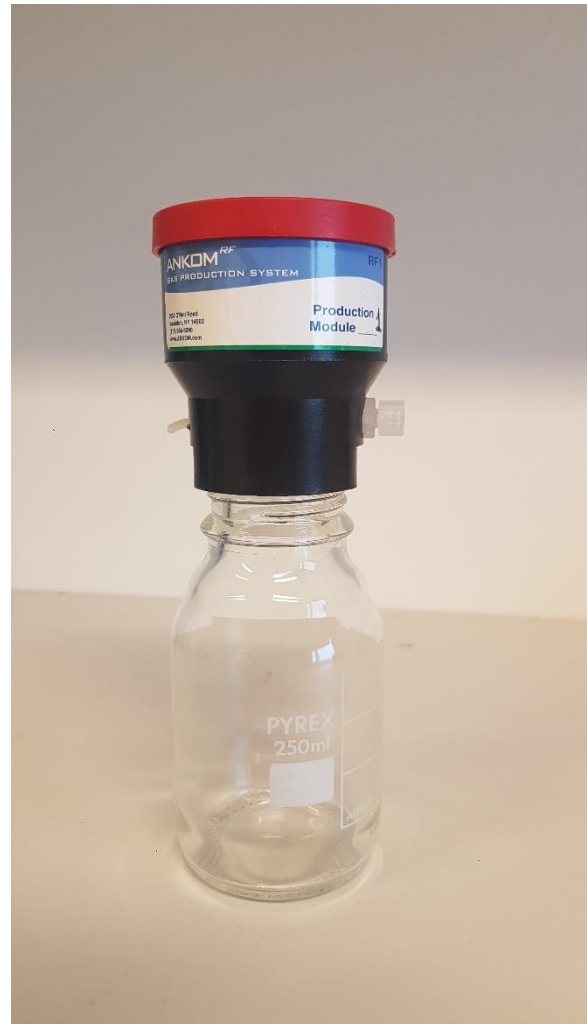
Dette tatt i betraktning er Daisy^{II} og iGP to metoder som har fordeler med tanke på at de er relativt enkle å utføre, de kan prosessere et stort antall prøver på en gang og er relativt billige sammenlignet med *in sacco* og *in vivo* forsøk.

3.0 Material og metode

Det ble i denne oppgaven benyttet to ulike *in vitro* metoder for å undersøke fordøyeligheten av tørrstoff (TS), NDF og råprotein. Disse var

ANKOM Daisy^{II} og ANKOM Gass produksjon (iGP). I tillegg ble fordøyelighet undersøkt *in sacco* og *in vivo* på sau. Det ble benyttet 32 ulike fôrprøver av totalt 86 rundballer samlet inn fra hele Norge sommeren 2017 i forbindelse med prosjektet Foods of Norway. Det ble i tillegg benyttet 22 andre prøver fra samme prosjekt fra en tidligere masteroppgave for å øke datagrunnlaget. Det totale antall prøver undersøkt ble dermed 54.

Samtlige forsøk ble utført på stoffskifteavdelingen på senter for husdyrfag (SFH) ved NMBU. Fôrprøvene benyttet til Daisy^{II} og iGP var tørket på 59°C og malt på 1 mm sold. Vomsaft i forbindelse med Daisy^{II} og iGP ble hentet fra tre vomfistulerte norsk rødt fe (NRF). Kyrne var ikke drektig og ikke i laktasjon. Kyrne sto på standard *in sacco* diet som betyr at de ble fôret med grovfôr:kraftfôr fordeling på 67:33 og med et råproteininnhold høyere enn 120 g/kg tørrstoff (Åkerlind et al., 2011). Kyrne ble fôret kl. 05:45 og vomsaft ble hentet ca. 4 timer etter fôring.



Figur 5. Bilde av inkubasjonsglass (250 ml) med trådløs trykkmåler på toppen benyttet for ANKOM gassproduksjon. Foto Ole Berner Bondø

3.1.0 Forsøksbeskrivelse

3.1.1 Daisy^{II}

Det ble benyttet fire forskjellige tidsintervaller (12, 24, 48 og 96 timer). Vaskeprøvene (0 timer) ble ikke inkubert i glass, men kun gjennomgått samme vaskeprosedyre som de andre tidsintervallene. For hver tidsperiode ble det benyttet 3 replikanter per fôr og 2 replikanter med standard fôr (CP175) i tillegg til en blank per inkubasjonsglass, totalt antall poser per inkubasjonsglass ble dermed 27 mot foreslått maksimum 25. Bortsett fra det var prosedyren som ble fulgt i henhold til beskrivelsen fra ANKOM-Technology (2017). Posene benyttet i forsøket var ANKOM F57 filterposer i polyester med en porestørrelse på 25 µm, laget for å holde igjen partikler som er ≥ 25 µm (Kelley et al., 2016).

Posene ble først vasket i aceton i fem minutter for å løse opp mulige stoffer som er med på å redusere overflatespenningen til posen og dermed påvirke den mikrobielle nedbrytningen. Etter lufttørking ble vekten til hver pose veid (BW¹), deretter ble det veid inn 1 gram prøve per pose (BW²). Posene ble forseglest med varmeforsegler og fordelt tilfeldig på fire ulike Daisy^{II}-inkubasjonsglass. Det ble inkludert en blank pose per glass for korreksjonsfaktor (C1), i tillegg ble to poser standard fôr (CP175) inkludert per glass for å undersøke variasjon. Hvert inkubasjonsskammer ble fylt med 1600 ml bufferløsning. Innholdet i bufferløsningene A og B er vist i Figur 5, og er i henhold til ANKOM-Technology (2017).

Før bufferløsning A og B ble blandet ble de forvarmet til en temperatur på 39 °C for så å blandes med hverandre i et 5:1 forhold til en pH på 6.8 ble nådd. Deretter ble 1600 ml av løsningen fylt i hvert Daisy^{II} glass med poser. Glassene ble deretter plassert direkte inn i inkubasjonsskammeret for å bli ekvilibriet til 39°C i 20-30 minutter mens vomsaft ble hentet.

Vomsaft ble hentet 4-4.5 timer etter morgenforingen og ble oppbevart på to forvarmede termosere for å unngå temperaturfall i vomvæsken. Vomvæsken ble videre filtrert gjennom et 200 µm nett for å skille grove partikler fra væsken. Vomvæsken ble filtrert over i en laboratorief flaske (2000 ml) og det ble det blåst CO₂-gass over vomsafta i flasken før den ble stengt med et pumpeinstrument og plassert i et 39°C vannbad. Det ble tilsatt 400 ml vomsaft i hvert inkubasjonsglass, samt at CO₂-gass ble fylt over buffer og

Bufferløsning A:

KH ₂ PO ₄	10.0 g/liter
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5 g/liter
NaCl	0.5 g/liter
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.1 g/liter
Urea	0.5 g/liter

Bufferløsning B:

Na ₂ CO ₃	15.0 g/liter
Na ₂ S*3H ₂ O	0.55 g/liter

Figur 6. Komposisjonen og mengdeforhold av de ulike komponentene som danner bufferløsning A og B for ANKOM Daisy inkubasjon.

vomsaftblandingen i ca. 30 sekunder før lokket ble satt på og glassene ble plassert tilbake i Daisy^{II}-inkubatoren. Det ble benyttet CO₂ som et virkemiddel for å presse ut oksygen som hadde kommet inn i de ulike beholderne benyttet.

Etter inkubasjon ble posene tatt ut og rensset med kaldt springvann til vannet ble klart, deretter ble samtlige vasket i vaskemaskin på ullprogram uten sentrifugering og med springkaldt vann. Etter vasking ble posene tørket på 45°C i 48 timer for så å bli veid både varm- og ekvilibrert (etter 24 timer). Vaskingen stopper den mikrobielle aktiviteten og frigjør mikrober fra fôrrester uten nødvendigvis å redusere mengde fôrrester (Nozière & Michalet-Doreau, 2000).

3.1.2 *In vitro* gassproduksjon

Forberedelser av bufferløsninger ble gjort i henhold til Goering et al. (1970) som angitt i Figur 6. Ettersom mengden av resaurizin 0.1 % og mikromineral løsningene var så små ble det lagd tilstrekkelig av begge løsningene for hele forsøket. De andre løsningene, *in vitro* buffer løsning, *in vitro* makromineraløsning og reduksjons løsning ble tillaget samme dag som de skulle brukes. Blandingen av de 5 forskjellige løsningene ble gjort i følgende rekkefølge: Makromineral-, buffer-, mikromineral-, resazurin-, destillert vann og reduserende løsning til et volum av bufferløsning på totalt 3700 ml. Når reduserende løsning ble tilsatt ble bufferløsningen mørk rosa. Dette indikerer at løsningen inneholder oksygen. For å fjerne oksygenet ble løsningen boblet med CO₂-gass til fargen gikk fra mørk rosa til helt blank.

Hele denne prosessen tok 10-15 minutter.

Bufferløsningen ble holdt i vannbad på 39°C frem til den skulle benyttes.

Det ble gjennomført to runder med 42 glassflasker per runde. Nøyaktig 1 gram prøve ble veid ut i hver flaske. Det ble valgt ut 12 fôrprøver fra de 32 testet i Daisy^{II}. Alle fôrprøvene ble testet med triplikater i tillegg til at det var 3 blanke flasker. Det vil si at totalt antall glassflasker var 84. Flaskene ble forvarmet til 39°C før 66 ml bufferløsning ble tilsatt. Etter fylling av bufferløsning ble det fylt CO₂-gass over løsningen i 5 sekunder før de ble stengt med sensorlokk som måler trykket inne i glassbeholderen (psi). Deretter ble glassene med

Resaruzin 0.1 %

Resaruzin 0.01 g/liter

***In vitro* buffer løsning**

NH₄HCO₃ 4.00 g/liter

NaHCO₃ 35.00 g/liter

***In vitro* micromineral løsning**

CaCl₂*2H₂O 13.20 g/liter

MnCl₂*4H₂O 10.00 g/liter

CoCl₂*6H₂O 1.00 g/liter

FeCl₃*6H₂O 8.00 g/liter

***In vitro* macromineral løsning**

Na₂HPO₄ 5.70 g/liter

KH₂PO₄ 6.20 g/liter

MgSO₄*7H₂O 0.60 g/liter

Reduserende løsning

Cysteine*HCl 6.25 g/liter

1N NaOH 40.00 ml/liter

Na₂S*9H₂O 6.25 g/liter

Figur 7. Komposisjonen og mengdeforholdet for de ulike løsningene som til sammen utgjør bufferløsningen til gassproduksjonssystemet.

prøve og bufferløsning plassert i inkubasjonskammer (varmeskap med veltebrett for omrøring) for ekvibrering i 20-30 minutter mens vomsaft ble hentet. Vomsaft ble hentet på samme måte som beskrevet under kapittel 3.1.1. 20 ml vomsaft ble deretter tilsatt hvert glass, etterfulgt av CO₂ gass i 5 sekunder. Glassene ble deretter satt tilbake i varmeskapene for inkubasjon i 72 timer.

Under inkubasjonstiden ble gass produsert automatisk registrert hvert 10. minutt. Etter inkubasjonstiden ble glassene tømt i hver sin nylonpose med 38 µm rutenett. Dette ble gjort for å kunne analysere restene for nedbrytningsgraden av tørrstoff. Nylonposene ble stengt med gummistrikk og vasket på samme vaskeprogram som Daisy^{II}-posene. Etter vask ble posene tørket på 45°C i 48 timer. Posevekt, varmvekt og 24 timers ekvilibriert vekt ble registrert.

3.1.3 *In sacco*

In sacco ble utført av stoffskifteavdelingen ved SHF. Metoden ble gjennomført etter NorFôr protokoll (Åkerlind et al., 2011) modifisert etter Madsen et al. (1995). Det ble benyttet ikke-lakterende kyr av rasen NRF. Dyrene ble fôret etter appetitt med en diet bestående av surfôr, halm og kraftfôr. Surfôr/halm:kraftfôr forholdet skal være 67:33. Når det gjelder råproteininnholdet i dietten bør det være over 120 g/kg TS, i tillegg til at kraftfôret minimum skal inneholde tre forskjellige proteinkilder. Fôr ble tildelt morgen og kveld, og alle kyrne hadde vært gjennom minst 14 dagers tilvenningsperiode.

Prøvematerialet ble frysetørket og malt på 1.5 mm sold. Det ble veid inn 2 g prøvemateriale per *in sacco* pose med 38 µm rutenett. For selve inkubasjonen ble følgende inkubasjonsintervaller benyttet: 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 og 96 timer, i tillegg til at iNDF ble bestemt ved 288 timers inkubasjon. Poser inkubert 2, 4 og 8 timer ble lagt inn 15-30 minutter etter morgenfôringen.

Poser som ble tatt ut fra vomma (inkludert 0 timer) ble umiddelbart rensert i kaldt springvann uten noen form for pressing eller mekanisk vask. Deretter ble posene vasket i en kommersiell vaskemaskin på ullprogram, uten sentrifugering og i springkaldt vann. Etter vasking ble posene tørket ved 45°C i 48 timer, for så å bli veid direkte etter inkubasjon i tørkeskap, og 24 timer ekvilibriert i romtemperatur for så å bli analysert for TS, NDF, aske og CHNS.

3.1.4 *In vivo* fordøyelighetsforsøk

In vivo ble gjennomført av stoffskifteavdelingen ved SHF. *In vivo* fordøyelighet ble målt ved bruk av sau som modelldyr. Sauer brukt i forsøket var kastrat av rasen Norsk Kvit sau (NKS).

Sauene ble veid ved starten av forsøksperioden (dag 11) og ved slutten av forsøket. Selve veiingen ble utført av SHF.

Prinsippet med forsøket er å måle gjødsel- og urinmengde i en periode på 10 dager. For å utjevne variasjon ble det benyttet tre sauer per fôr. Til sammen ble det benyttet 15 sauer. Sauene ble plassert i hver sin metabolisemboks som er konstruert for å skille gjødsel og urin fra hverandre. Selve forsøket varer i 21 dager, hvor de første 11 dagene er tilvenningsperiode av fôret de skulle teste. I tilvenningsperioden gjøres det ingen registreringer.

Under forsøksperioden skal gjødsel, urin og fôrrester samles og veies for hver dag. Oversikt over forsøksstruktur vises i Tabell 1. Gjødsel og urin fylles i tette spann og dypfryses til forsøkets slutt hvor det veies på nytt for så å blandes og gjødselen kvernes i en kompostkvern, før en representativ prøve tas ut.

Tabell 1. Oversikt over forsøksstruktur

Forberedelsestid	11 dager
Forsøksstid med gjødsel, urin og fôrrest. oppsamling	10 dager
I alt	21 dager

Ved oppsamlingen av urin ble daglig urinmengde veid, hvorav 10 % av den daglige urinoppsamlingen ble tatt ut og tatt vare på til forsøksperiodens slutt. For å beholde en pH lavere enn 4, ble det tilsatt svovelsyre (10 %).

Sauene fôres to ganger daglig, halve rasjonen på morgenen (kl. 07:30) og resten på ettermiddagen (kl. 15:00). Hver morgen gis det i tillegg 10 g salt og 35 g mineralnæring. Vann etterfylles i vannkar ved behov. Innsamling av prøvemateriell som gjødsel, urin og fôrrester ble samlet inn hver morgen.

Dagsrasjonene av fôrmidlene ble veid opp for hele forsøket under tilvenningsperioden og holdt fryst fremt til noen dager før de ble benyttet. Sauene skal fôres etter appetitt, det ble dermed gitt mellom 1000 – 1200 g/TS per dag. Daglig mengde av fôr ble tilpasset under tilvenningsfasen for å unngå mye fôrrester, da dette øker kostnadene og reduserer nøyaktigheten i forsøket.

3.2.0 Kjemisk analyse

Restene etter inkubasjon og prøvene som ble frysetørket ble analysert for TS, aske, NDF og CHNS («Carbon», Hydrogen, Nitrogen og Svovel analyse). NDF-, aske og TS analysene ble gjort med materiale som var malt med 1 mm sold, mens for CHNS ble materialet malt i en kulemølle for å sørge for at det var fint nok for analyse.

Alle fôrprøvene i forbindelse med Daisy^{II}, iGP og *in sacco* ble analysert for NDF, aske og CHNS. For *in vivo* forsøket ble det analysert for NDF, aske, råprotein og råfett.

For Daisy^{II} ble en av de tre replikatene sendt direkte til NDF og askeanalyse, mens de andre to posene ble tømt og malt i en kulemølle med 30 i frekvens i 60 sekunder. Restene fra kulemøllen ble sendt til CHNS analyse.

For iGP ble de seks replikatene blandet med en kaffekvern for homogenisering samtidig som fôrpartiklene ikke skulle bli for fint malt. Restene ble sendt til NDF-, aske- og CHNS analyse. NDF analysene måtte bli tatt med prøver som var malt på maks 1 mm, finere malegrad enn dette kan føre til tap av partikler.

Alle analyser i forbindelse med forsøket ble gjort av LabTek. LabTek er et laboratorie som har tilhørighet ved NMBU.

NDF-analysen ble gjort ved aNDFom, som vil si at NDF ble fremstilt ved bruk av α -amylase som bryter ned stivelsen i fôrprøven sammen med en nøytral såpeblanding, dette fører til at celleinnholdet løses opp, mens celleveggfraksjonen forblir uløst. Prøven ble askekorrigert ved at prøven ble forasket ved 550 °C (Berg, 2018b).

CHNS ble analysert for å finne den totale mengden av karbon, hydrogen, nitrogen og svovel i fôrprøvene. Analysen går ut på forbrenning av fôrprøven i et oksygenrikt miljø. Temperaturen i forbrenningsrøret er 1150 °C. De ulike komponentene blir overført til tre ulike kolonner hvor de detekteres av en varmetrådesdetektor (TDC) (Berg, 2018c). Tørrstoff ble analysert ved at fôrprøvene ble tørket ved 103°C ± 2°C til konstant vekt (Berg, 2018a).

3.3.0 Beregninger og Statistisk analyse

Dataprogrammer benyttet for beregninger var SAS 9.4. (Statistical Analysis Software Institute Inc., Cary, NC, USA) og Excel (versjon 16001.13127.20638.0) Microsoft Corporation.

3.3.1 Daisy^{II}

Tørrstofftap (IVTD) ble beregnet i samsvar med ANKOM-Technology (2017) (Formel 2):

$$\% IVTD_{DM} = \frac{100 - (W_3 - (W_1 * C_1)) * 100}{W_2 * DM} \quad [2]$$

Hvor W_1 er pose vekt; W_2 er fôrprøvens vekt før inkubasjon; W_3 er posens vekt etter inkubasjon inkludert prøverestene; C_1 er blankkorreksjonen beregnet ved blank vekt etter inkubasjon delt på posens taravekt. Dette ble beregnet for hver enkel pose.

Tap av NDF ble beregnet i henhold til Åkerlind et al. (2011) ved bruk av Formel 3:

$$NDFD_t = \frac{NDF - NDF_t}{NDF} \quad [3]$$

Hvor $NDFD_t$ er NDF nedbrutt ved tidspunkt t , g/g; NDF_t er den gjenværende mengden NDF ved tidspunkt t ; NDF er mengden NDF i prøvematerialet som blir benyttet ved inkubasjon.

3.3.2 iGP

iGP systemet registrerte gasstrykk inne i beholderen i psi, og for å kunne benytte disse verdiene i beregningene må de omgjøres til ml/g. Dette ble gjort i henhold til ANKOM-Technology (2018) ved å benytte Avogardo's lov om «ideal» gass i Formel 4:

$$N = p * \frac{V}{R * T} \quad [4]$$

Hvor N er gass produsert i molar (mol); p er trykket i kilopascal (kPa); V er volum i glassflaske i liter (l); T er temperaturen i kelvin (K); og R er gasskonstanten ($8.314472 \text{ L} \cdot \text{kPa} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Omgjøring fra psi til kPa ble gjort ved å multiplisere psi verdien med korreksjonsfaktoren, 1 psi = 6.894757293 kilopascal. Volumet ble beregnet ved å ta volumet til flasken subtrahert med volumet til prøveinnholdet + bufferløsnings okkupasjonsmengde i flasken, som i dette tilfellet var $0.31 - 0.1 = 0.21$. For blankprøvene ble det beregnet en gjennomsnittsverdi og korrigert for hver flaske. Ved bruk av Avogardo's lov vil 1 mol okkuperer 22.4 l ved 273.15 °K og 101.325 kPa. Dermed kan gass målt i mol beregnes som gass målt i milliliter (ml) etter Formel 5:

$$\text{Gass produsert (mL)} = n * 22.4 * 1000 \quad [5]$$

Hvor n er gass produsert i molar (ANKOM-Technology, 2018).

Estimering av gassproduksjonskurvene ble gjort i henhold til Groot et al. (1996) sin enkeltfase-modell, Formel 6 ved bruk av NLIN funksjonen i SAS (9.4):

$$G = \frac{A_i}{1 + \frac{B_i}{t^{C_i}}} \quad [6]$$

Hvor G er mengden gass produsert per gram TS ved tidspunkt t etter inkubasjon; A er gass produsert i mL per gram tørrstoff; B er tidspunktet etter inkubasjon hvor halvparten av gassproduksjonen har funnet sted; C er en konstant som bestemmer kurvens form; t er inkubasjonstiden i timer.

Tiden fra inkubasjonens start til det tidspunktet hvor nedbrytningsraten var den høyeste (t_{RM}) ble beregnet med Formel 7 (Groot et al., 1996):

$$t_{RM} = B * (C - 1)^{\frac{1}{C}} \quad [7]$$

Den fraksjonelle nedbrytningsraten ble beregnet ved Formel 8 i henhold til Groot et al. (1996):

$$R = \frac{Ct^{C-1}}{B^C + t^C} \quad [8]$$

Hvor R er den fraksjonelle nedbrytningsraten; C er en konstant som bestemmer kurvens form; t er inkubasjonstiden i timer; B er tidspunktet etter inkubasjonen hvor halvparten av gassproduksjonen har funnet sted.

3.3.3 *In sacco*

Beregninger av TS- og NDF tap ble gjort ved bruk av Formel 9:

$$TSD = \frac{TS - TS_t}{TS} * 100 \quad [9]$$

Hvor TSD er tørrstoff nedbrutt i %; TS er mengde prøve som ble tilsatt posen i gram; TS_t er mengde rester etter inkubasjon i gram ved tidspunkt t. Tap av NDF ble beregnet på samme måte ved å bytte ut mengde TS med NDF.

Nedbrytningsprofilen for hvert fôr ble beregnet med Formel 10 i henhold til Ørskov og McDonald (1979) ved bruk av NLIN funksjonen i SAS (9.4):

$$PT = A + B * (1 - e^{-C*t}) \quad [10]$$

Hvor PT er prosenttap ved inkubasjonstidspunkt t; A er den vannløselige fraksjonen av fôrmiddelet; B er den potensielt nedbrytbare fraksjonen av fôrmiddelet; C er nedbrytningshastigheten til B.

Nedbrytningsgraden for hvert fôr ble beregnet med Formel 11 i henhold til Ørskov og McDonald (1979):

$$NG = A + \frac{B * C}{C * k} \quad [11]$$

Hvor NG er nedbrytningsgrad; A er den løselige fraksjonen i fôrmiddelet; B er den potensielt nedbrytbare fraksjonen i fôrmiddelet; C er nedbrytningshastigheten for B; k er passasjehastighet fra vom.

Den totale fraksjonen av løselig og potensielt nedbrytbart materiale (D) beregnes ut fra å addere A og B etter Formel 12:

$$D = A + B \quad [12]$$

3.3.4 *In vivo*

In vivo fordøyelighet ble beregnet etter Formel 13:

$$Fordøyelighet = \frac{A - B}{A} \quad [13]$$

Hvor A er den gjennomsnittlige mengden næringsstoffer spist; B er gjennomsnittlig mengde ufordøyde næringsstoffer skilt ut.

3.3.5 Statistisk analyse

For regresjonsanalyse ble funksjonen «proc reg» i SAS 9.4 benyttet, med en uavhengig og en avhengig variabel i modellen. For korrelasjonsanalyse mellom de forskjellige parameterne ble funksjonen «proc corr» i SAS 9.4 benyttet. Sammenligning av de ulike fôrprøvene ble testet med sammenligningsprosedyren Duncan's med signifikant verdi $p < 0.05$.

4.0 Resultater

4.1.0 Kjemisk sammensetning i fôrvarer

Tabell 2 presenterer den kjemiske sammensetningen til samtlige 54 fôrpøver undersøkt. Fôrpøver undersøkt i den tidligere masteroppgaven ble spesifisert med EL-nr. under opprinnelse. Det ble ikke gjennomført noen form for statistisk analyse av fôrenes sammensetning, men tall verdiene viser høy variasjon i kjemisk sammensetning for de ulike fôrene. Tørrstoffinnholdet varierte fra 17.9 % i surfôr 92 til 86.1 % i halmfôr 173. Mengde NDF varierte fra 408 g/kg TS i surfôr 115 til 789 g/kg TS i halmfôr 174. Høyest råproteininnhold for surfôrene var 230 g/kg TS i surfôr 97, mens maissurfôr 172 hadde 364 g/kg TS. Fôret med laveste innhold av råprotein var halmfôret 173 med 47 g/kg TS. Fôr 172 var maissurfôr, og var det eneste fôret i dette eksperimentet som inneholdt stivelse.

Tabell 2. Tørrstoffinnhold (TS) (g/kg) og kjemisk sammensetning (g/kg TS) for de 54 ulike rundballene undersøkt og benyttet for Daisy¹, iGP, *in sacco* og *in vivo* fordøyelighetsforsøk.

Fôr	Opprinnelse	TS	Aske	Råfett	NDF ⁶	Råprotein	Organisk stoff
91	OBB-1	295	89	27	521	156	911
92	OBB-2	179	108	46	485	189	892
94	EL-1	238	45	22	592	97	955
95	EL-2	248	78	37	545	181	922
96	EL-3	289	79	26	545	130	921
97	OBB-3	313	100	32	478	230	900
98	OBB-4	559	71	26	505	164	929
100	OBB-5	381	72	23	610	138	928
101	OBB-6	336	79	20	527	110	921
102	OBB-7	473	73	21	604	139	927
103	EL-4	520	66	20	529	99	934
104	OBB-8	604	51	24	617	137	949
105	OBB-9	389	61	18	574	112	939
106	EL-5	693	76	19	576	105	924
107	OBB-10	428	87	25	481	141	913
108	OBB-11	309	89	26	536	101	911
109	OBB-12	449	75	24	587	145	925
110	OBB-13	363	73	25	621	125	927
111	EL-6	360	98	25	420	143	902
112	OBB-14	440	118	31	451	155	882
113	EL-7	303	80	34	539	168	920
114	EL-8	431	49	18	601	93	951
115	EL-9	414	144	31	408	165	856
117	OBB-15	308	40	20	637	124	960
118	OBB-16	392	66	20	420	143	934
120	EL-10	245	104	35	490	165	896
121	EL-11	360	75	22	415	157	925
122	OBB-17	280	51	20	578	122	949
127	OBB-18	390	91	29	493	176	909
128	OBB-19	521	79	24	594	126	921
132	OBB-20	341	81	29	482	193	919
133	EL-12	429	43	23	590	116	957
137	OBB-21	351	65	22	560	127	935
139	OBB-22	261	73	30	573	127	927
141	OBB-23	384	65	17	635	96	935
142	EL-13	413	69	21	609	115	931
143	EL-14	684	55	12	644	84	945
144	EL-15	236	85	26	565	103	915
145	EL-16	219	77	34	546	181	923
146	EL-17	268	94	30	486	185	906
147	EL-18	297	94	27	543	142	906
148	OBB-24	230	49	23	595	139	951
149	OBB-25	221	47	25	635	122	953
150	OBB-26	278	63	23	483	99	937
151	OBB-27	421	66	17	541	145	934
152	EL-19	473	69	21	553	129	931
153	EL-20	265	67	21	569	95	933
154	EL-21	348	58	16	620	105	942
160	EL-22	552	69	24	515	101	931
172 ¹	OBB-28	267	.	.	784	364	.
173 ²	OBB-29	861	83	9	779	47	917
174 ³	OBB-30	818	53	14	789	103	947
175 ⁴	OBB-31	797	61	11	779	155	939
176 ⁵	OBB-32	804	53	13	778	192	947
Gjennomsnitt		402	74	24	567	136	926
Min		179	40	9	408	47	856
Max		861	144	46	789	230	960

¹ mais-surfôr

²⁻⁵ halm

⁶ Neutral detergent fiber

Tabell 3 viser gjennomsnittsverdien for de 54 fôrprøvene gruppert etter NDF innhold. De ble gruppert innen Lav, Middels og Høy innhold av NDF. Hvor Lav inneholdt >450 g/kg TS, Middels inneholdt <450<550 g/kg TS og Høy inneholdt >550 g/kg TS.

Tørrstoffinnholdet i gruppen Middels var laves med 344 g/kg og høyest i gruppen Høy med 447 g/kg. Gjennomsnittlig innhold av NDF var henholdsvis 416, 511 og 629 g/kg TS for gruppene Lav, Middels og Høy. Råproteininnholdet for Lav og Middels var det samme med 152 og 153 g/kg TS, mens det for gruppen Høy var noe lavere med 121 g/kg TS.

Tabell 3. Kjemisk innhold for de 54 fôrprøvene gruppert etter innhold av NDF, der gruppe Lav inneholder >450 g NDF/kg TS, gruppe Middels inneholder mellom 450 og 550 g NDF/kg TS og gruppe Høy inneholder over 550 g NDF/kg TS. Gjennomsnittsverdier (g/kg TS) for de ulike næringsstoffene ± standardavviket.

	TS ¹ g/kg	Aske	Råfett	NDF ²	Råprotein	Organisk stoff
Lav (n=4)	382±27	96±35	24±5	416±6	152±11	767±45
Middels (n=21)	344±107	85±15	29±7	511±29	153±36	794±20
Høyt (n=29)	447±196	62±13	20±5	629±75	121±31	837±27

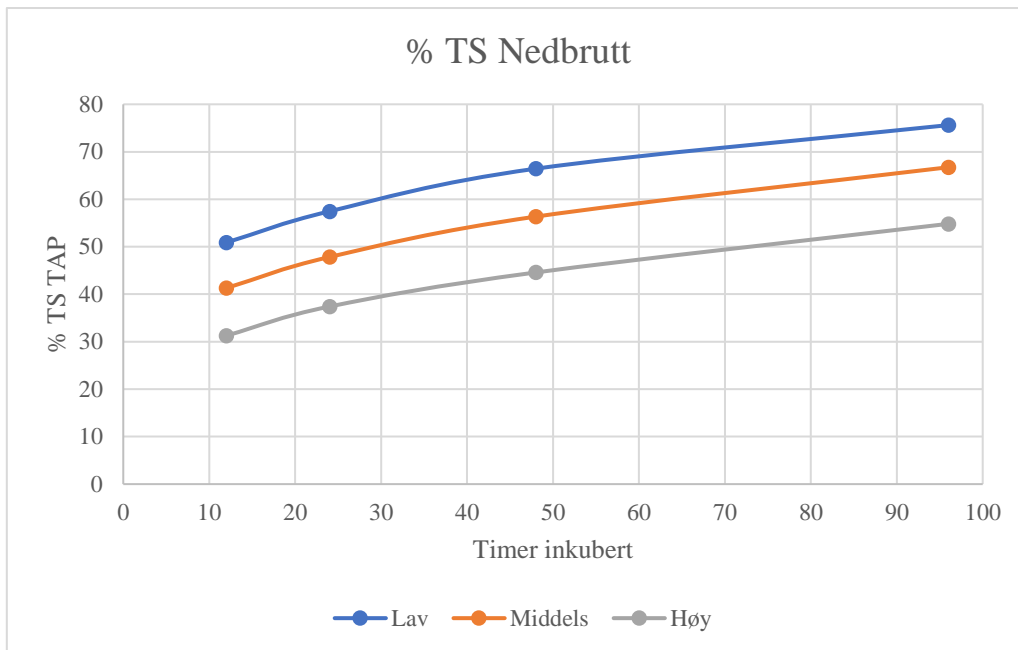
¹ Tørrstoff

² Neutral detergent fiber

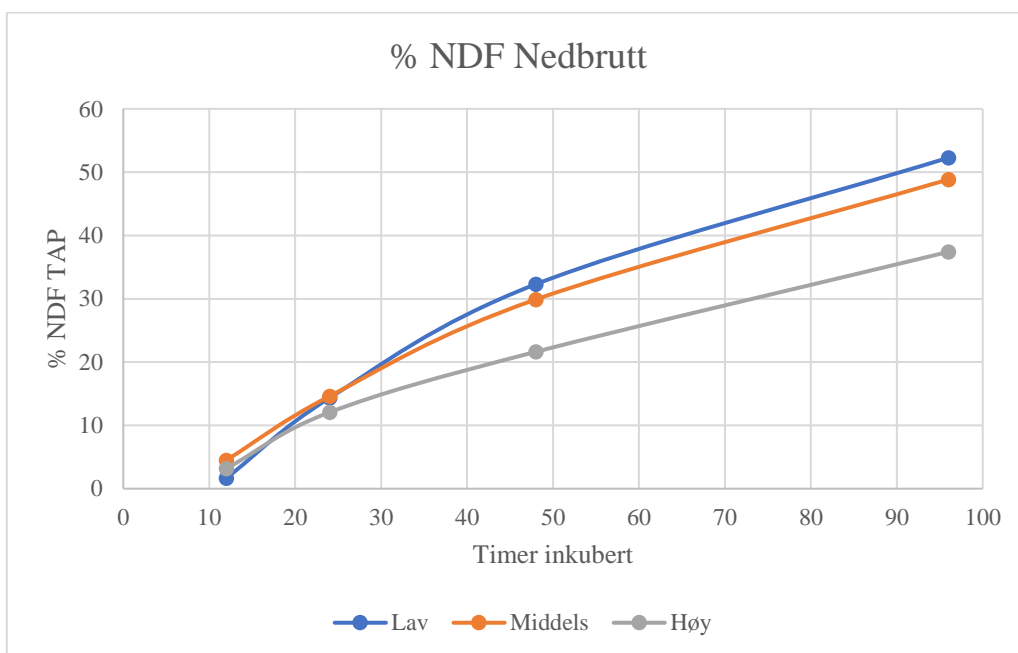
4.1.1 Daisy^{II}

Fordøyelseskurven for TS og NDF er presentert i Figur 8 og 9. Fordøyeligheten av TS var lavest for gruppen Høy og høyest for gruppen Lav.

Fordøyelighetskurven for NDF viser at gruppen Lav skjærer kurven for Middels og Høy mellom 12 og 24 timers. For enkeltfôr var det høyest nedbrytningsgrad av TS og NDF i fôr 112 med henholdsvis 76 og 68 %, mens det var lavest fordøyelighet i fôr 173 med 31 % for TS og fôr 117 med 22 % for NDF.



Figur 8. Fordøyelighetskurve (%) for tørrstoff (TS) ved 12, 24, 48 og 96 timers inkubasjon i Daisy^{II}.



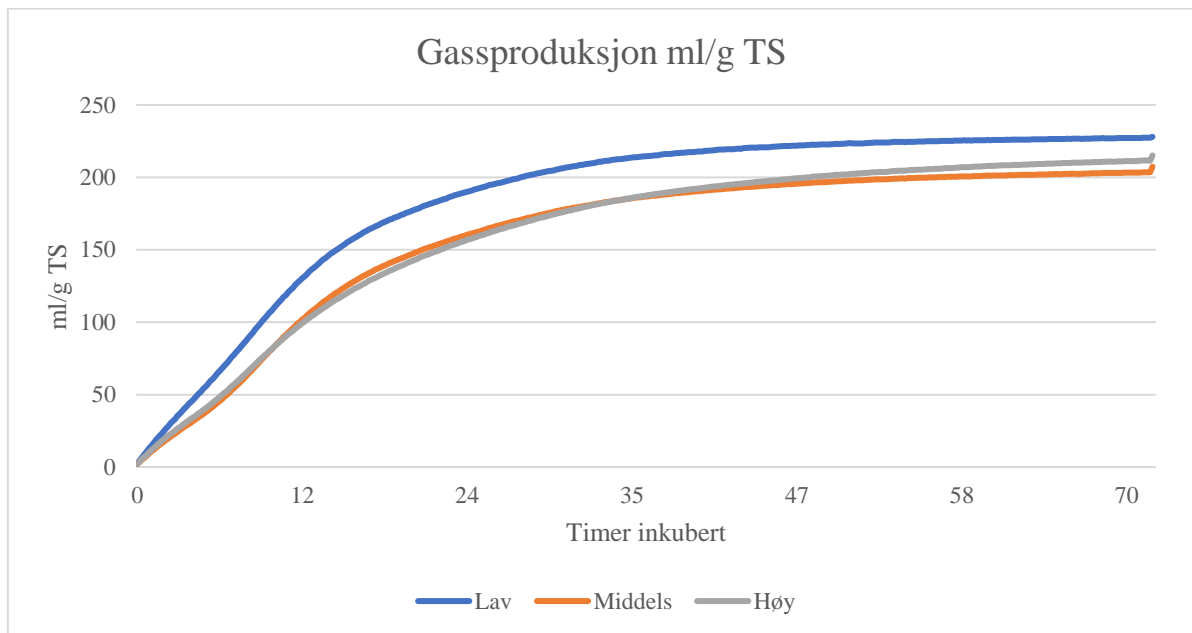
Figur 9. Fordøyelighetskurve (%) for NDF ved 12, 24, 48 og 96 timers inkubasjon i ANKOM Daisy inkubator.

Fordøyeligheten (%) var høyere for TS enn for NDF fra starten av, mens fordøyeligheten til NDF hadde en gradvis økning fra 12 timer til 96 timer inkubasjon. Samtidig var det lite som skilte gruppen Lav med Middels.

4.1.2 iGP

Gassproduksjonen målt ved bruk av ANKOM Gassproduksjons system er presentert i Figur 10 og sammenstilt i kategoriene Lav, Middels og Høy innhold av NDF. Det ble gjort

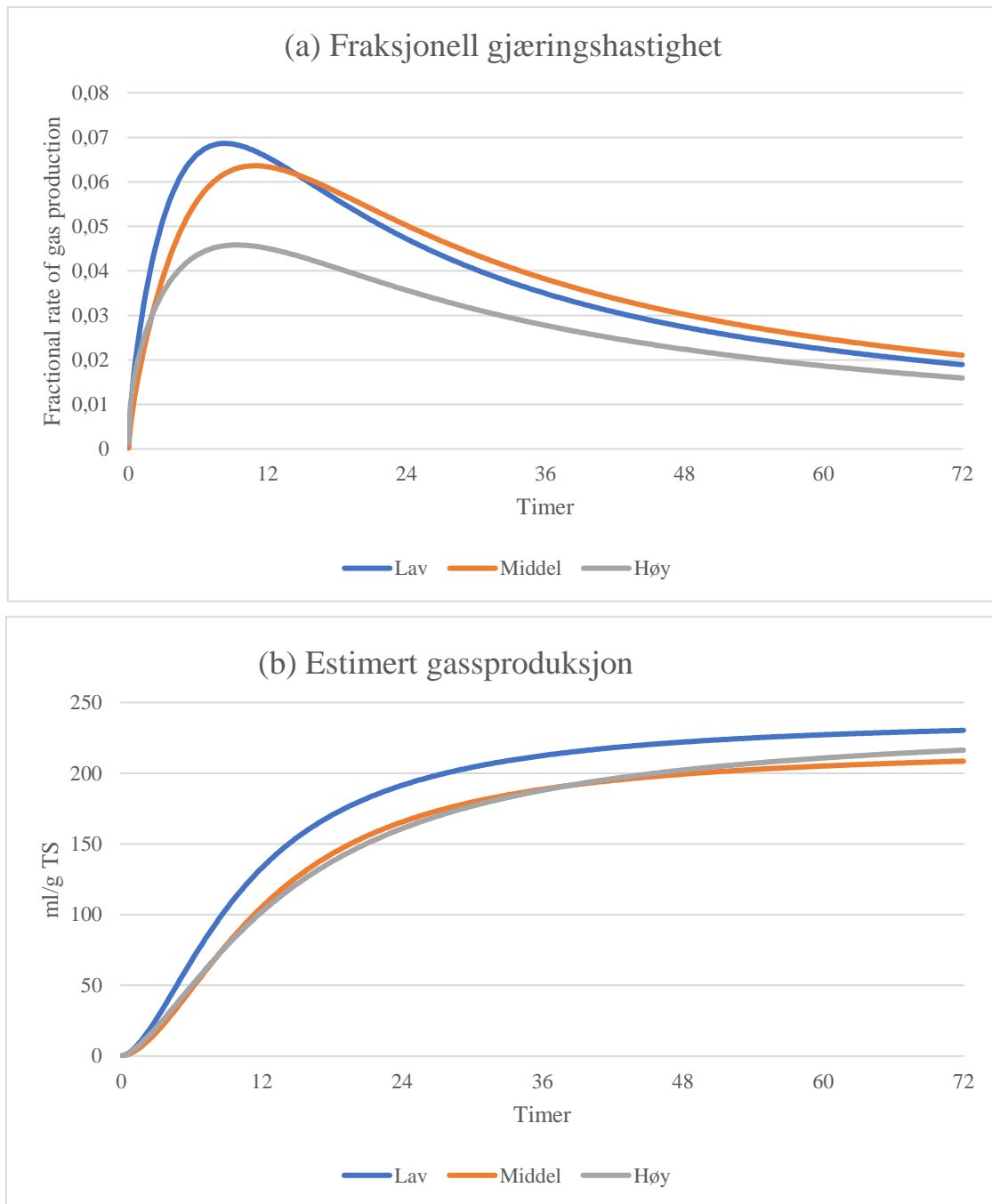
korreksjon for blankprøver da det ble observert fermentering. Det ble i tillegg til de 12 fôrene som ble undersøkt selv, lagt til et datasett fra tidligere undersøkelse som inkluderer 22 fôr av de totalt 54, dermed inngår totalt 34 fôrpøver i datasettet for iGP.



Figur 10. Gassproduksjon målt over 72 timer for gruppene Lav, Middels og Høy innhold av NDF.

For gruppene Middels og Høy var det relativ lik utvikling i gassproduksjon. Gruppen Høy endte opp med høyere total gassproduksjon enn Middels. Etter 72 timer flatet kurvene ut for alle tre grupper.

Figur 11a og 11b viser fraksjonell gjæringshastighet (r) og beregnede gassproduksjon (ml/g TS) for de tre ulike NDF gruppene. Den fraksjonelle gjæringshastigheten øker tidlig i inkubasjonsfasen, og synker gradvis med antall timer. Gruppen Lav hadde høyest fraksjonell gjæringshastighet og kortest intervall til tidspunktet hvor fermenteringen var på sitt maksimale (t_{RM}). Gruppen Høy nådde t_{RM} før gruppen Middels, mens Middels nådde høyere fraksjonell gjæringshastighet sammenlignet et med gruppen Høy. De beregnede gassproduksjonskurvene (Figur 11b) gjengir formen til den målte gassproduksjonen vist i Figur 10.



Figur 11. (a) Fraksjonell gjæringsshastighet og (b) beregnet gassproduksjon Groot et al. (1996) for gruppene Lav, Middels og Høy innhold av NDF.

Tabell 4 sammenligner målt gassproduksjon og beregnet gassproduksjon etter Groot et al. (1996). Det var signifikant forskjell ($P < 0.001$) mellom de ulike grupperingene. For enkeltfôr er minimumsverdiene for den målte (=146.5 ml/g TS) og beregnede (=177.6 ml/g TS) gassproduksjonen for fôr 117 og maksimumsverdiene for den målte (=259.9 ml/g TS) og beregnede (= 272.0 ml/g TS) var fôr 160.

Tabell 4. Sammenligning av målt-med beregnet 72 timers gassproduksjon for gruppene Lav, Medium og Høy innhold av NDF \pm SD. Tørrstofftap i % for restene etter inkubasjon, samt pH i inkubasjonsvæsken etter 72 timer. Minimumsverdier og maksimumsverdier for de ulike fôrene undersøkt.

Fôr	Målt (ml/gTS)	Beregnet (ml/g TS)	Differanse (ml/g TS)	TS-tap ¹ (%)	pH
Lav (n=4)	228.0 \pm 16.3 ^a	239.5 \pm 18.0 ^a	11.5	78.6 \pm 7.7 ^a	6.49 \pm 0.05 ^a
Middel (n=16)	207.4 \pm 22.2 ^b	218.5 \pm 24.7 ^b	11.1	78.9 \pm 3.4 ^a	6.51 \pm 0.06 ^a
Høy (n=14)	215.2 \pm 23.9 ^{ab}	237.1 \pm 23.4 ^a	21.9	73.2 \pm 6.1 ^b	6.50 \pm 0.06 ^a
Gjennomsnitt	213.0	228.6	-	76.5	6.51
Min	146.5	177.6	-	59.0	6.38
Maks	259.9	272.0	-	89.2	6.64

^{a,b} Verdier innen kolonnen er forskjellig hvis bokstav er forskjellig ($P < 0.05$)

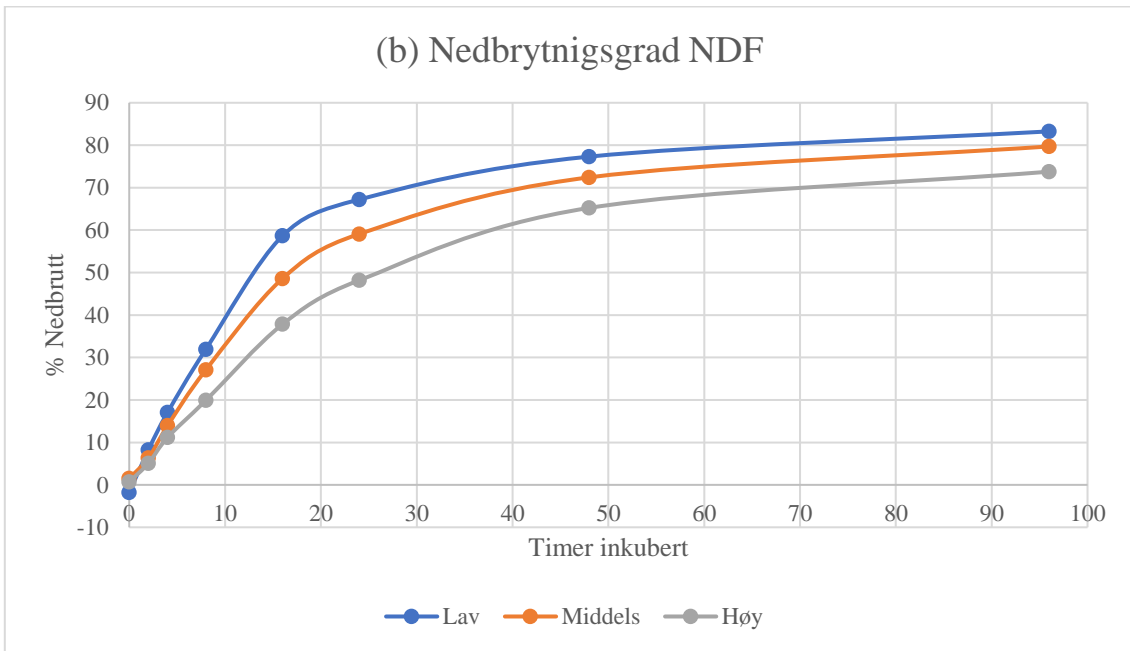
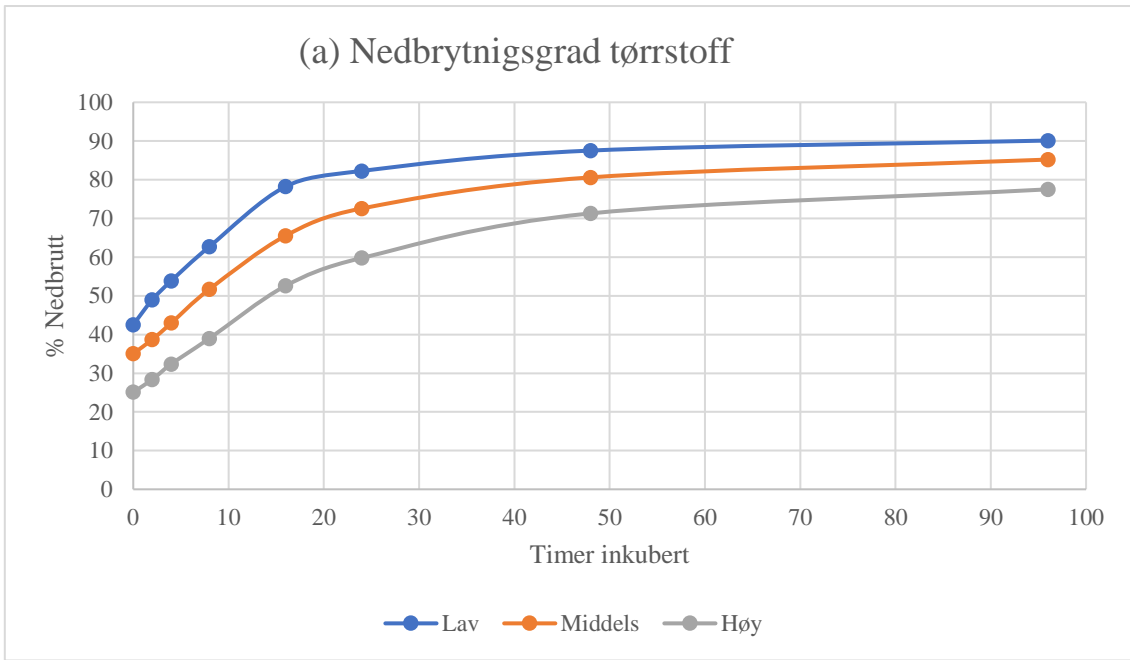
¹ Tørrstoff-tap

Resultatene for TS-tap i Tabell 4 viser hvor mye av TS som ble fermentert i løpet av de 72 timene inkubert. Det var registrert høyere TS-tap hos gruppen Lav sammenlignet med gruppen Høy, mens det mellom Lav og Middels var ingen signifikant forskjell ($p < 0.05$).

Det ble målt pH av samtlige prøver ved slutten av inkubasjonen. De forskjellige pH målingene viser ingen signifikant forskjell ($p < 0.05$) mellom de ulike gruppene med innhold av NDF. Ingen av pH målingene var under 6.2.

4.1.3 *In sacco*

Nedbrytningskurven for TS og NDF er fremstilt i Figur 12 a og b. Gruppen Lav hadde høyest nedbrytningsgrad både for TS og NDF, hvor 60 % av NDF'en var brutt ned etter 16 timer og viser at fermenteringskapasiteten til fôrvarer med lavere innhold av NDF var høyere, og særlig mellom 12 og 24 timer. Etter 96 timers inkubasjon hadde mengden NDF mindre betydning for den totale nedbrytningsgraden.



Figur 12. Nedbryningskurver (%) for tørrstoff (TS) og «neutral detergent fiber» (NDF) ved bruk av in sacco metoden.

Det var i gjennomsnitt 12 % forskjell i nedbrytningsgraden av TS mellom gruppen Lav og gruppen Høy mens det var 11 % forskjell mellom Lav og Høy for nedbrytningen av NDF. Fra 24 timers inkubasjon viser gruppen Høy en relativt høyere nedbrytningsgrad i forhold til gruppen Lav for nedbrytningskurven til NDF.

4.1.4 *In vivo*

In vivo apparent fordøyelighet av TS, aske, NDF, råprotein (CP), råfett og organisk stoff er fremstilt i Tabell 5.

Tabell 5. Apparent fordøyelighet av TS, aske, NDF, råprotein (CP), råfett og organisk stoff ved bruk av *in vivo* fordøyelighetsforsøk.

	Lav (n=4)	Middel (n=21)	Høy (n=29)
TS ¹	76±5.6 ^a	72±4.8 ^{ab}	66±9.5 ^b
Aske	53±11.7 ^a	55±9.2 ^a	48±24.7 ^b
NDF ²	81±6.0 ^a	79±4.2 ^a	73±9.5 ^b
CP ³	80±3.9 ^a	77±5.9 ^{ab}	71±14.4 ^b
Råfett	58±11.2 ^a	53±12.8 ^a	47±24.9 ^b
Org.stoff	80±4.4 ^a	75±4.0 ^{ab}	69±9.5 ^b

^{a,b} Verdier innen rad er forskjellig hvis bokstav er forskjellig ($P < 0.05$)

¹ Tørrstoff

² Neutral detergent fiber

³ Crude protein = Råprotein

Fordøyelighet av TS og organisk stoff var signifikant forskjellige ($p < 0.05$) mellom de ulike gruppene med forskjellig NDF-innhold. Gruppen Lav har høyest fordøyelighet av NDF med 81 %, mens Middels og Høy hadde henholdsvis 79 og 73 % nedbrytningsgrad. Ved økt innhold av NDF reduseres råproteinfordøyelsen fra 80 % til 71 % mellom Lav og Høy.

4.2.0 Sammenligning mellom metodene

Dette kapitlet handler om hvor godt de fire forskjellige metodene korrelerte med hverandre. Ut fra samspill mellom de ulike metodene ble det vist til et utvalg av korrelasjoner mellom de forskjellige fordøyelighetsparameterne presentert i tabeller. Interessante korrelasjoner ble presentert i spredningsplott. De ulike resultatene var med på å skape et bilde av hvor godt egnet de forskjellige metodene var for å undersøke fordøyeligheten hos drøvtyggere. Alle resultater i dette kapitlet ekskluderer fôr 172 – 176 da disse skiller seg ut fra de andre surfôrene, og ville gitt feilaktig resultater.

4.2.1 Daisy^{II} - iGP

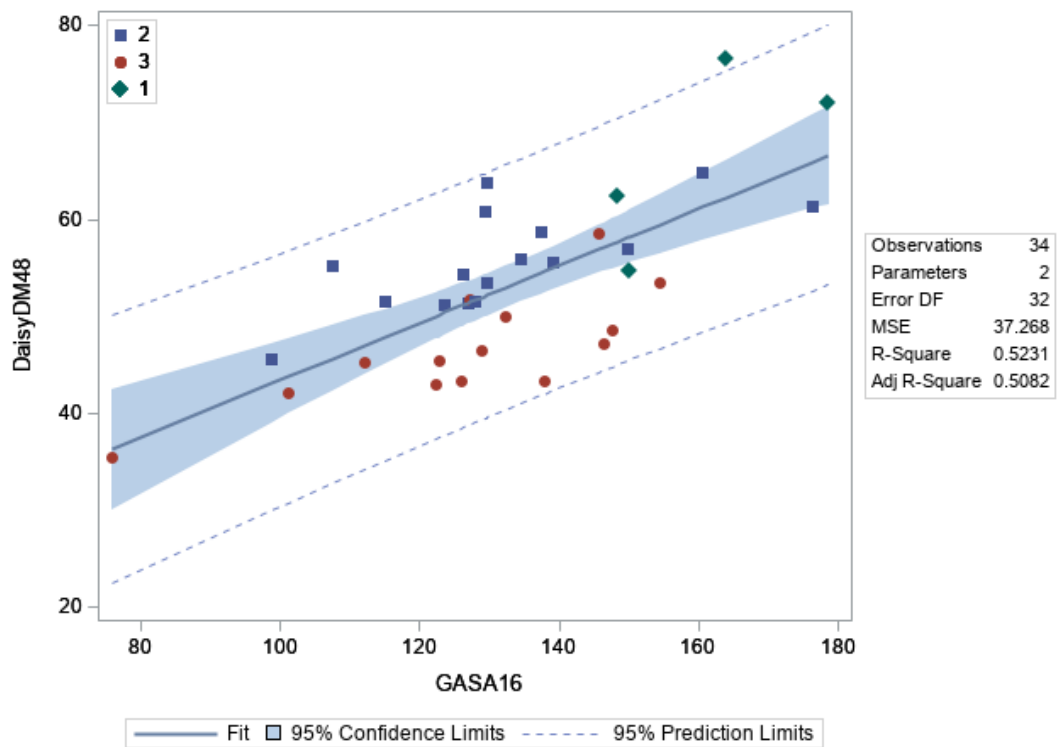
Korrelasjoner (r) og p -verdier mellom metodene Daisy^{II} og iGP er vist i Tabell 6, og viser hvordan TS- og NDF fordøyelighet etter 12, 24, 48 og 96 timer inkubasjon i Daisy^{II} korrelerer med konstantene A og B beregnet for iGP på bakgrunn av Groot et al. (1996) for 48 og 72 timer inkubasjon. Konstanten A representerer den beregnede gassproduksjonen og konstant B representerer tiden etter starttidspunktet for inkubasjonen til halvparten av gassproduksjonen hadde funnet sted.

Tabell 6. Korrelasjon (r) og p-verdi for iGP og Daisy^{II}

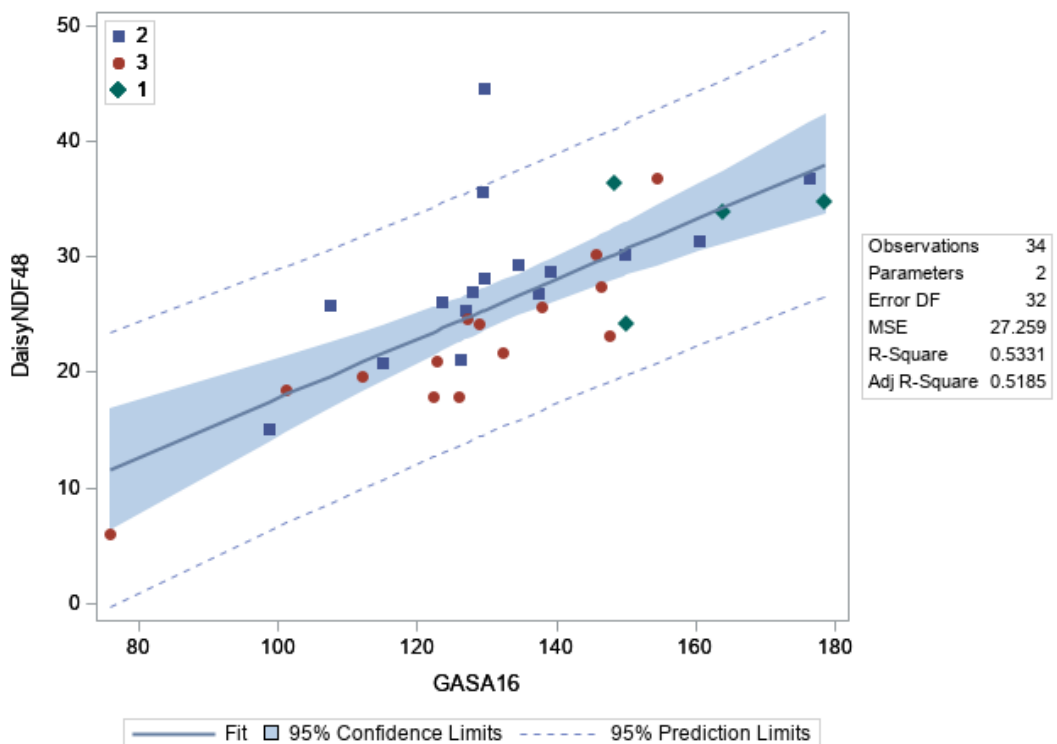
Tørrstoff og NDF						
	GASA16	GASA24	GASA48	GASA72	GASB72	GASB48
DaisyDM12	0.63125 (<.0001)	0.5923 (0.0002)	0.43947 (0.0093)	0.16145 (0.1579)	-0.68652 (<.0001)	-0.61479 (<.0001)
DaisyDM24	0.67757 (<.0001)	0.64622 (<.0001)	0.49093 (0.0032)	0.16647 (0.1426)	-0.70887 (<.0001)	-0.6286 (<.0001)
DaisyDM48	0.72328 (<.0001)	0.69405 (<.0001)	0.55359 (0.0007)	0.22525 (0.0459)	-0.75374 (<.0001)	-0.68089 (<.0001)
DaisyDM96	0.65121 (<.0001)	0.62474 (<.0001)	0.45764 (0.0065)	0.11743 (0.3027)	-0.73986 (<.0001)	-0.6763 (<.0001)
DaisyNDF12	0.28062 (0.1079)	0.28492 (0.1024)	0.2525 (0.1497)	0.09721 (0.4760)	-0.21787 (0.1067)	-0.1912 (0.2502)
DaisyNDF24	0.42845 (0.0115)	0.42987 (0.0112)	0.33271 (0.0545)	0.16253 (0.2314)	-0.30072 (0.0243)	-0.35732 (0.0276)
DaisyNDF48	0.73014 (<.0001)	0.72403 (<.0001)	0.62876 (<.0001)	0.34049 (0.0102)	-0.64672 (<.0001)	-0.66444 (<.0001)
DaisyNDF96	0.49351 (0.003)	0.49141 (0.0032)	0.31858 (0.0663)	0.02795 (0.8380)	-0.71263 (<.0001)	-0.67791 (<.0001)

GASA = Beregnet total gassproduksjon (ml/g TS), GASB = Tidspunkt hvor halvparten av gassen var produsert, DaisyDM = Nedbrytningsgraden av TS for Daisy^{II}, DaisyNDF = Nedbrytningsgraden av NDF for Daisy^{II}

Både for DaisyDM og DaisyNDF hadde relativt lav korrelasjon med den beregnede gassproduksjonen (GASA) for 72 timer, men for 16 og 24 timer inkubasjon var den høyere. Ved 48 timer inkubert i Daisy^{II} var det høyest korrelasjon for både TS og NDF med GASA16 (r=0.72 og 0.73) Det ble observert høy negativ korrelasjon mellom GASB og Daisy^{II} etter 48 og 96 timer. GASB og DaisyDM96 korrelerte med -0.74, og GASB og DaisyNDF96 korrelerte med -0.71. Det lineære forholdet mellom GASA16 og DaisyDM48 er vist i Figur 13 og mellom GASA16 og DaisyNDF48 i Figur 14.



Figur 13. Spredingsplott av TS fordøyelighet etter 48 timer i Daisy^{II} (DaisyDM48) og beregnede A verdier for gassproduksjon etter 16 timer (GASA16). $\diamond/1$ = lavt innhold av NDF, $\square/2$ = middels innhold av NDF, $\bullet/3$ = Høyt innhold av NDF.



Figur 14. Spredingsplott av NDF fordøyelighet etter 48 timer i Daisy^{II} (DaisyNDF48) og beregnede A verdier for gassproduksjon etter 16 timer (GASA16). $\diamond/1$ = lavt innhold av NDF, $\square/2$ = middels innhold av NDF, $\bullet/3$ = Høyt innhold av NDF.

4.2.2 Daisy^{II} - *In sacco*

Korrelasjoner (r) og p-verdier mellom Daisy^{II} og *in sacco* er vist i Tabell 6 og tar for seg alle nedbrytningsparametere for Daisy^{II} samt et utvalgt av *in sacco* nedbrytningsparametere.

Tabellen tar ikke med løselig NDF (ANDF) og totalt fordøyelig NDF (DNDF) da løselig NDF var antatt å være 0, og at DNDF da blir det samme som BNDF. Det var en generell sterk sammenheng mellom Daisy^{II} og *in sacco*.

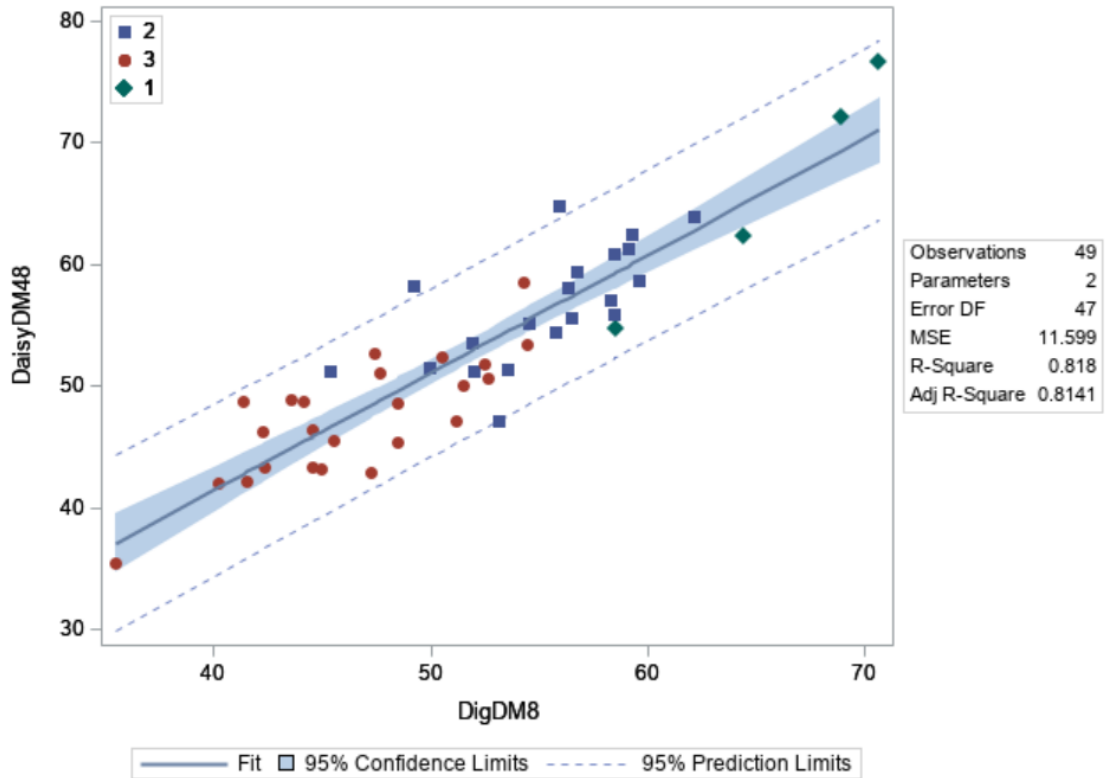
Tabell 7. Korrelasjon (r) og p-verdi mellom *in sacco* og Daisy^{II} parameter for TS og NDF.

	TS				
	ADM	BDM	DDM	DM48	DigDM8
DaisyDM12	0.90353 (<.0001)	-0.2867 (0.0458)	0.7732 (<.0001)	0.79857 (<.0001)	0.8965 (<.0001)
DaisyDM24	0.84774 (<.0001)	-0.20727 (0.153)	0.77455 (<.0001)	0.79762 (<.0001)	0.86434 (<.0001)
DaisyDM48	0.84272 (<.0001)	-0.12833 (0.3795)	0.83176 (<.0001)	0.84864 (<.0001)	0.90442 (<.0001)
DaisyDM96	0.81478 (<.0001)	-0.08847 (0.5455)	0.83249 (<.0001)	0.83698 (<.0001)	0.85796 (<.0001)
	NDF				
	BNDF	NDF48	NDF96	DigNDF3	
DaisyDM12	0.62929 (<.0001)	0.67043 (<.0001)	0.64007 (<.0001)	0.71624 (<.0001)	
DaisyDM24	0.63562 (<.0001)	0.69346 (<.0001)	0.6525 (<.0001)	0.73071 (<.0001)	
DaisyDM48	0.70966 (<.0001)	0.75271 (<.0001)	0.72871 (<.0001)	0.79499 (<.0001)	
DaisyDM96	0.70587 (<.0001)	0.76778 (<.0001)	0.72266 (<.0001)	0.78715 (<.0001)	
DaisyNDF12	0.12357 (0.3976)	0.1152 (0.4306)	0.12715 (0.384)	0.07862 (0.5913)	
DaisyNDF24	0.26187 (0.0691)	0.34306 (0.0158)	0.31775 (0.0261)	0.34658 (0.0147)	
DaisyNDF48	0.70098 (<.0001)	0.72789 (<.0001)	0.71961 (<.0001)	0.73554 (<.0001)	
DaisyNDF96	0.63924 (<.0001)	0.73384 (<.0001)	0.6821 (<.0001)	0.71803 (<.0001)	

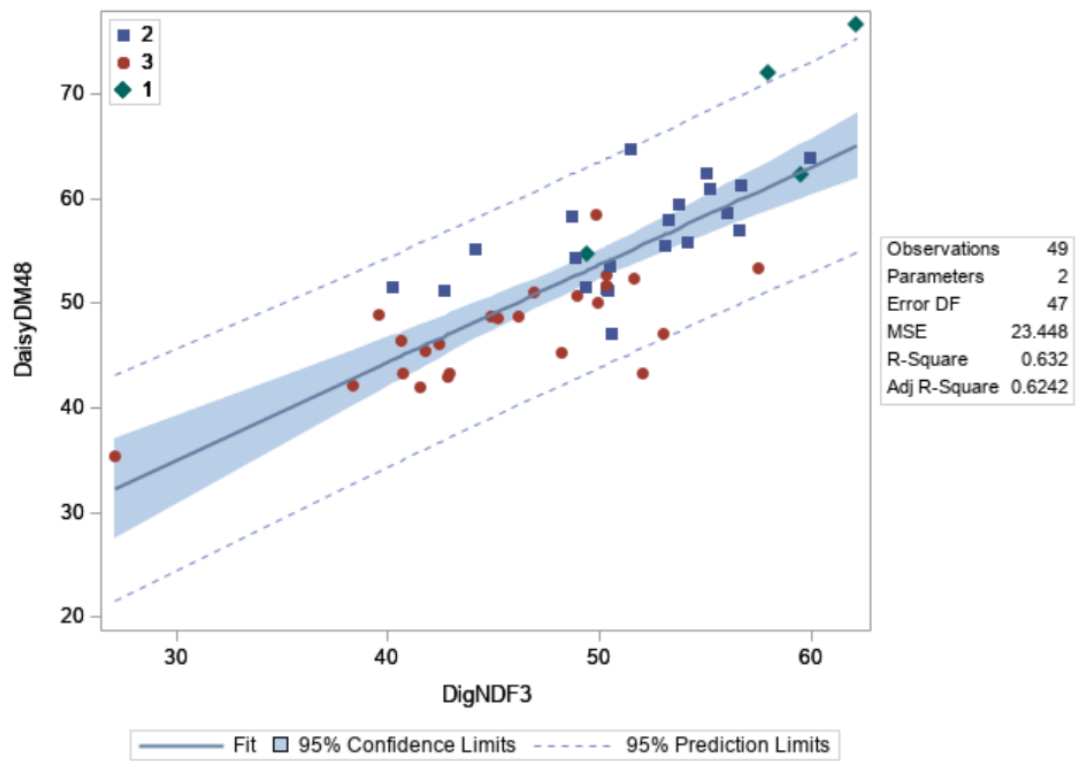
ADM = Løselig tørrstoff, BDM = Potensielt nedbrytbart tørrstoff, CDM = Nedbrytningshastighet for BDM, DDM = ADM + BDM, DigDM8 = Beregnet nedbrytningsgrad for tørrstoff med en passasjehastighet på 8 %/t, BNDF = Potensielt nedbrytbart NDF, DigNDF3 = Beregnet nedbrytningsgrad for NDF med en passasjehastighet på 3%/t, NDF48 = Nedbrytningsgraden av NDF etter 48 timer inkubert med *in sacco*, Daisy inkubasjon for tørrstoff (DM) og NDF for de forskjellige tidsintervallene 12, 24, 48 og 96 timer

Det var en sterk sammenheng mellom samtlige Daisy^{II}-parameterne for TS og DigDM8, med høyest korrelasjon for DaisyDM48 (r = 0.90). Den lineære sammenheng mellom DaisyDM48 og DigDM8 er fremstilt i Figur 15. Det var relativt sterk korrelasjon mellom DDM og DaisyDM48 (r = 0.83). Sammenligning av NDF parameterne viser en gradvis økning i korrelasjon mellom DaisyNDF48 og DigNDF3 etter hvert som inkubasjonstiden øker (r = 0.74). For nedbrytning av NDF var korrelasjonen med DigNDF3 mellom DaisyDM96

sterkere enn DaisyNDF96 (0.77 mot 0.73). Spredningsplott mellom DaisyDM96 og DigNDF3 er vist i Figur 16. Det var relativt lik korrelasjon mellom NDF48 og Daisy^{II} parameterne. Lav korrelasjon mellom nedbrytningsgraden av nitrogen for Daiys^{II} og *in sacco* ble observert, og ble dermed ikke inkludert i tabellen.



Figur 15. Spredningsplott av nedbrytningsgraden av TS for 48 timers inkubasjon i Daisy^{II} (DaisyDM48) og beregnet nedbrytningsgrad for TS i vom med 8 % passasje per time fra *in sacco* (DigDM8). $\diamond/1$ = lavt innhold av NDF, $\square/2$ = middels innhold av NDF, $\bullet/3$ = Høyt innhold av NDF.



Figur 16. Spredningsplott av nedbrytningsgraden av TS (DM) for 48 timers inkubasjon i Daisy^{II} (DaisyDM48) og beregnet nedbrytningsgrad av NDF i vom med 3 % passasje per time fra in sacco (DigNDF3). $\diamond/1$ = lavt innhold av NDF, $\square/2$ = middels innhold av NDF, $\bullet/3$ = Høyt innhold av NDF.

4.2.3 iGP - *in sacco*

Korrelasjonen (r) og p-verdier mellom iGP og *in sacco* er vist i Tabell 8. Antall observasjoner for GASB48 gjelder kun 22 av de 54 fôrene undersøkt og var fra tidligere undersøkelser (EL).

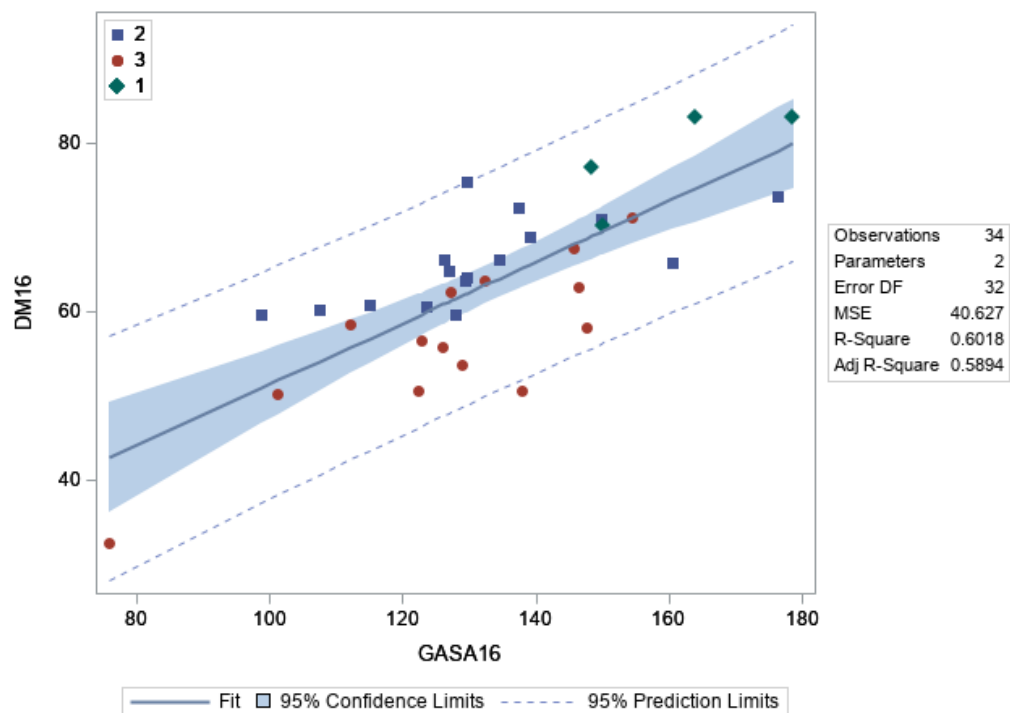
Tabell 8. Korrelasjon (r) og p-verdi mellom *in vitro* gassproduksjon (iGP) og *in sacco*.

	Tørrstoff og NDF					
	GASA16	GASA24	GASA48	GASA72	GASB48	GASB72
DM16	0.77745 (<.0001)	0.75386 (<.0001)	-0.1605 (0.4871)	0.28253 (0.1055)	-0.77354 (<.0001)	-0.85341 (<.0001)
DM24	0.69696 (<.0001)	0.6693 (<.0001)	-0.20784 (0.366)	0.14432 (0.4155)	-0.79662 (<.0001)	-0.84037 (<.0001)
DM48	0.69791 (<.0001)	0.67821 (<.0001)	-0.17731 (0.4419)	0.16173 (0.3608)	-0.78158 (<.0001)	-0.85453 (<.0001)
DM96	0.73513 (<.0001)	0.73208 (<.0001)	-0.1787 (0.4383)	0.25738 (0.1417)	-0.81747 (<.0001)	-0.85104 (<.0001)
CDM	0.76025 (<.0001)	0.72639 (<.0001)	-0.1425 (0.5378)	0.36933 (0.0316)	-0.66194 (0.0011)	-0.72917 (<.0001)
DDM	0.68661 (<.0001)	0.67418 (<.0001)	-0.1752 (0.4475)	0.17358 (0.3262)	-0.80321 (<.0001)	-0.82471 (<.0001)
DigDM8	0.6904 (<.0001)	0.65099 (<.0001)	-0.17479 (0.4486)	0.12547 (0.4796)	-0.74334 (0.0001)	-0.83148 (<.0001)
NDF24	0.70961 (<.0001)	0.69831 (<.0001)	-0.18386 (0.4250)	0.22324 (0.2044)	-0.76832 (<.0001)	-0.80161 (<.0001)
NDF48	0.68940 (<.0001)	0.68717 (<.0001)	-0.16476 (0.4754)	0.21317 (0.2261)	-0.75708 (<.0001)	-0.81598 (<.0001)
NDF96	0.72659 (<.0001)	0.73924 (<.0001)	-0.15096 (0.5136)	0.31407 (0.0705)	-0.76608 (<.0001)	-0.79936 (<.0001)
BNDF	0.73088 (<.0001)	0.73602 (<.0001)	-0.14643 (0.5265)	0.32979 (0.0568)	-0.74076 (0.0001)	-0.77022 (<.0001)
DigNDF3	0.72408 (<.0001)	0.71784 (<.0001)	-0.15826 (0.4932)	0.25161 (0.1512)	-0.76626 (<.0001)	-0.81467 (<.0001)

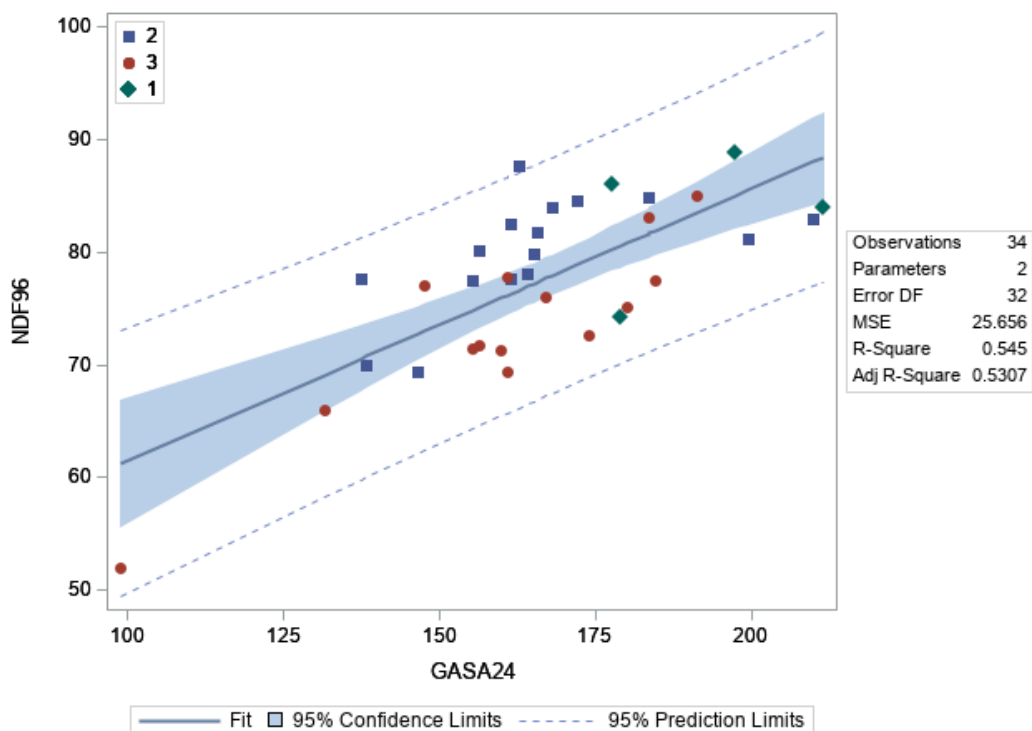
DM og NDF(16, 24, 48 & 96) = Målt *in sacco* nedbrytning, CDM = Nedbrytningshastigheten til TS, DDM = Totalt fordøyd (løselig og potensielt) TS, DigDM8 = Beregnet nedbrytningsgrad for TS i *in sacco* med en passasjehastighet med 8 %/t, NDF48 = NDF nedbrutt etter 48 timer inkubert *in sacco*, BNDF = Potensielt nedbrytbart NDF, DigNDF3 = Beregnet nedbrytningsgrad for NDF *in sacco* med en passasjehastighet med 3 %/t, GASA = Beregnet gassproduksjon for ANKOM GP, GASB = Tidspunkt hvor halvparten av gassproduksjonen hadde funnet sted.

Tabellen viser en relativt svak korrelasjon mellom beregnet gassproduksjon for 72 timer (GASA72) og *in sacco* parameterne, men en sterkere korrelasjon mellom 16, 24 og 48 timers gassproduksjon. Nedbrytningsgraden av TS for *in sacco* hadde høyest korrelasjon for 16 timers gassproduksjon. Nedbrytningsgraden av NDF for *in sacco* hadde høy korrelasjon, og var relativt lik mellom 16 og 24 timers gassproduksjon. Det var også en sterk sammenheng mellom de øvrige *in sacco* parameterne mot GASB (<.0001). Nedbrytningshastigheten til TS (CDM) ble beregnet, og viste seg å ha høy korrelasjon med GASA16 (r = 0.76)

Figur 17 viser spredningsplott av den lineære sammenhengen mellom DM16 og GAS16, og Figur 18 viser spredningsplott av den lineære sammenhengen mellom NDF96 og GASA24.



Figur 17. Spredningsplott mellom målt nedbrytningsgrad av TS for 16 timers in sacco (DM16) og beregnet A verdi for in vitro gass produksjon etter 16 timer (GASA16). $\diamond/1$ = lavt innhold av NDF, $\square/2$ = middels innhold av NDF, $\bullet/3$ = Høyt innhold av NDF.



Figur 18. Spredningsplott mellom målt nedbrytningsgraden for NDF 96 timers in sacco (NDF96) med beregnet A verdi for 24 timer iGP (GASA24). $\diamond/1$ = lavt innhold av NDF, $\square/2$ = middels innhold av NDF, $\bullet/3$ = Høyt innhold av NDF.

4.2.4 *In vivo* - Daisy^{II}

Korrelasjon (r) og p-verdier mellom *in vivo* fordøyelighetsforsøk og Daisy^{II} er vist i Tabell 9. Det ble registrert middels korrelasjon for TS- og NDF fordøyelighet mellom de to metodene. For nedbrytningsgraden av nitrogen ble det registrert lav korrelasjon og den er dermed ikke inkludert i tabellen.

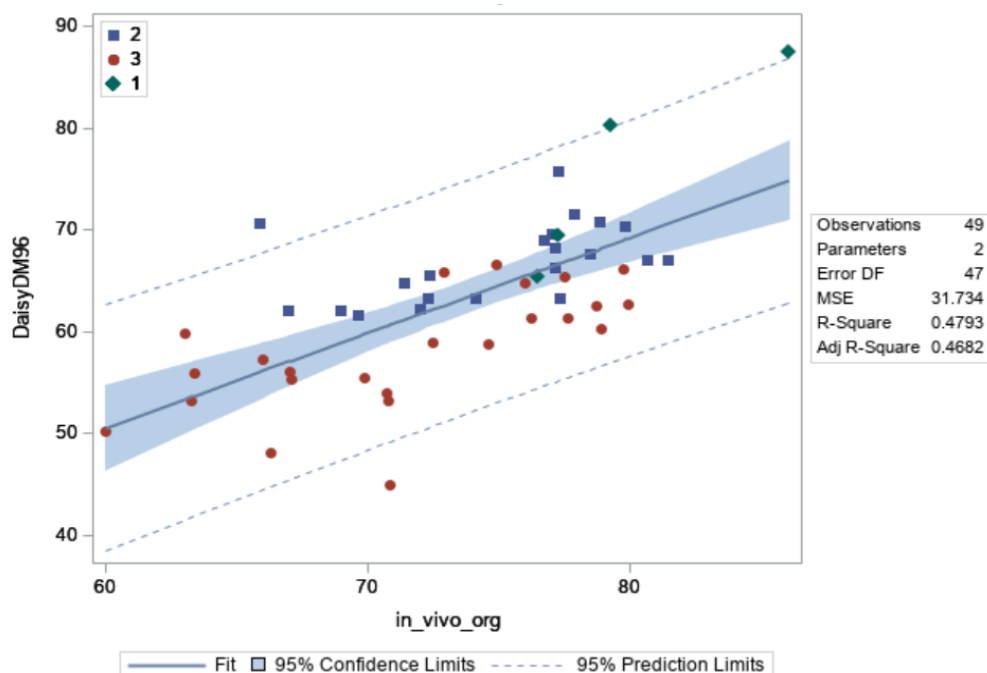
Tabell 9. Korrelasjon (r) og p-verdier mellom *in vivo* fordøyelighetsforsøk og Daisy^{II} inkubasjon.

	<i>In vivo</i> TS	<i>In vivo</i> NDF	<i>In vivo</i> org.	<i>In vivo</i> N
DaisyDM12	0.60773 (<.0001)	0.5515 (<.0001)	0.62291 (<.0001)	0.33605 (0.0182)
DaisyDM24	0.62274 (<.0001)	0.57092 (<.0001)	0.64523 (<.0001)	0.35908 (0.0113)
DaisyDM48	0.61931 (<.0001)	0.58772 (<.0001)	0.63907 (<.0001)	0.35455 (0.0124)
DaisyDM96	0.6695 (<.0001)	0.64946 (<.0001)	0.69229 (<.0001)	0.42747 (0.0022)
DaisyNDF12	0.14967 (0.3047)	0.08143 (0.5781)	0.10317 (0.4805)	0.09531 (0.5148)
DaisyNDF24	0.28291 (0.0489)	0.29641 (0.0386)	0.28935 (0.0437)	0.21858 (0.1313)
DaisyNDF48	0.47976 (0.0005)	0.50797 (0.0002)	0.48725 (0.0004)	0.32991 (0.0206)
DaisyNDF96	0.55865 (<.0001)	0.62312 (<.0001)	0.59681 (<.0001)	0.43106 (0.002)

Daisy^{II} fordøyelighet (12, 24, 48 og 96 timer) for tørrstoff (DM) og NDF, og *In vivo* fordøyelighet for tørrstoff (TS), NDF og organisk stoff (org.)

In vivo fordøyelighet av TS og organisk stoff hadde en middels korrelasjon med nedbrytningsgraden av TS for alle Daisy^{II}-tidsintervaller, men er høyest for 96 timers inkubasjon (r=0.67 og r=0.69). NDF nedbrytning for Daisy^{II} og *in vivo* fordøyelighet hadde en korrelasjon på 0.62.

Figur 19 viser et spredningsplott mellom nedbrytningsgraden av TS inkubert 96 timer i Daisy^{II} (DaisyDM96) og *in vivo* fordøyelighet av organisk stoff (*in_vivo_org*). Det var relativt lav R² mellom disse to parameterne (0.48). Enkelte uteliggere ligger utenfor 95 % prediksjonslinjene.



Figur 19. Spredningsplott mellom nedbrytningsgraden av TS inkubert 96 timer i Daisy^{II} (DaisyDM96) og *in vivo* fordøyelighet for organisk stoff (*in_vivo_org*). ◊/1 = lavt innhold av NDF, ◻/2 = middels innhold av NDF, ●/3 = Høyt innhold av NDF.

4.2.5 *In vivo* - iGP

Korrelasjon (r) og p -verdier mellom *in vivo* fordøyelighetsforsøk og iGP er vist i Tabell 10. Korrelasjonen mellom *in vivo* fordøyelighetsforsøk og iGP var lavere enn Daisy^{II} og *in sacco*. Korrelasjon mellom den beregnede gassproduksjonen (GASA) og *in vivo* parameterne var relativt lav (<0.5). Det var desto høyere korrelasjon (-0.54 - -0.69) mellom punktet hvor halvparten av gassproduksjonen hadde funnet sted (GASB) og *in vivo* parameterne.

Tabell 10. Korrelasjoner (r) og p -verdier mellom *in vivo* fordøyelighet og *in vitro* gassproduksjon.

	<i>In vivo</i> TS	<i>In vivo</i> NDF	<i>In vivo</i> N	<i>In vivo</i> org
GASA16	0.45699 (0.0059)	0.45869 (0.0064)	0.09048 (0.6108)	0.49501 (0.0029)
GASA24	0.44176 (0.0089)	0.46353 (0.0058)	0.0365 (0.8376)	0.4717 (0.0049)
GASA48	0.32038 (0.0647)	0.35976 (0.0366)	-0.13812 (0.4360)	0.33966 (0.0494)
GASA72	0.05456 (0.7592)	0.08743 (0.6229)	-0.39353 (0.0213)	0.05917 (0.7396)
GASB48	-0.67906 (0.0007)	-0.64982 (0.0014)	-0.54682 (0.0103)	-0.69388 (0.0005)
GASB72	-0.55968 (0.0006)	-0.54787 (0.0008)	-0.38163 (0.0259)	-0.59425 (0.0002)

In vivo fordøyelighet for TS, NDF, nitrogen (N) og organisk stoff (org), GASA = beregnet gassproduksjon, GASB = tid fra start av inkubasjon til halvparten av gassproduksjonen er produsert, GASC = Konstant som bestemmer kurvens karakteristika.

4.2.6 *In vivo* - *in sacco*

Korrelasjoner (r) og p-verdier mellom *in vivo* og *in sacco* er vist i Tabell 11.

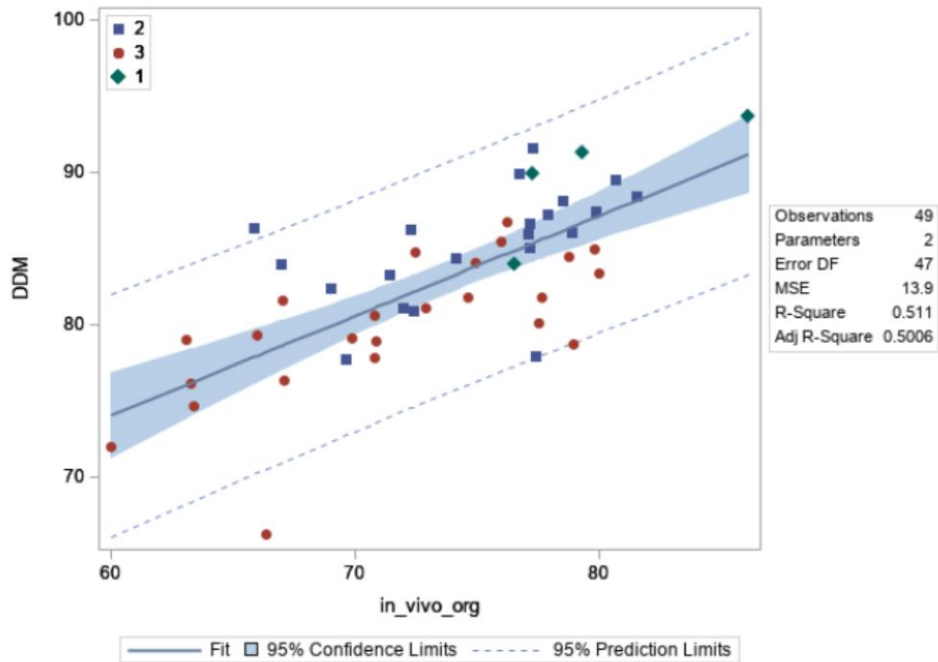
Fordøyelighetsparametere for TS, NDF, nitrogen (N) og andel organisk stoff(org). For de ulike næringsstoffene TS, NDF og nitrogen var det høyest korrelasjon mellom DDM og *in vivo* DM, NDF og organiskstoff (r = 0.69, r = 0.72, r = 0.71). For NDF var det høyest korrelasjon for mellom BNDF og *in vivo* NDF (r=0.74), men også NDF48 korrelerer godt (r=0.72).

Tabell 11. Korrelasjoner (r) og p-verdier mellom *in vivo* fordøyelighet og fordøyelighetsparametere for *in sacco*.

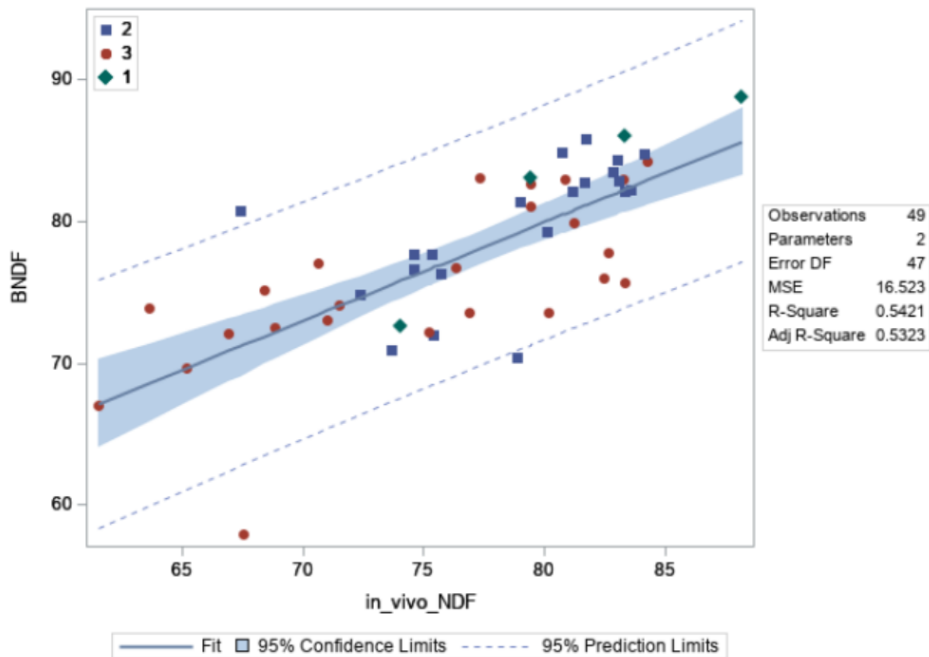
	<i>In vivo</i> TS	<i>In vivo</i> NDF	<i>In vivo</i> org	<i>In vivo</i> N
DM24	0.60628 (<.0001)	0.61576 (<.0001)	0.63894 (<.0001)	0.30935 (0.0305)
DM48	0.6392 (<.0001)	0.67391 (<.0001)	0.67471 (<.0001)	0.3111 (0.0296)
DM96	0.60814 (<.0001)	0.64349 (<.0001)	0.62912 (<.0001)	0.22012 (0.1286)
DDM	0.68824 (<.0001)	0.72285 (<.0001)	0.71481 (<.0001)	0.30981 (0.0303)
DigDM8	0.55862 (<.0001)	0.55041 (<.0001)	0.59455 (<.0001)	0.26839 (0.0622)
NDF24	0.59863 (<.0001)	0.62972 (<.0001)	0.62006 (<.0001)	0.3297 (0.0207)
NDF48	0.65223 (<.0001)	0.72273 (<.0001)	0.68117 (<.0001)	0.3278 (0.0215)
NDF96	0.60443 (<.0001)	0.66945 (<.0001)	0.6192 (<.0001)	0.2207 (0.1275)
BNDF	0.64966 (<.0001)	0.73626 (<.0001)	0.68196 (<.0001)	0.24815 (0.0856)
DigNDF3	0.58849 (<.0001)	0.62735 (<.0001)	0.60737 (<.0001)	0.2920 (0.0418)
N24	0.46912 (0.0007)	0.50355 (0.0002)	0.49172 (0.0003)	0.47255 (0.0006)
N48	0.51126 (0.0002)	0.49962 (0.0003)	0.50812 (0.0003)	0.44024 (0.0020)
N96	0.19394 (0.4406)	0.32901 (0.1825)	0.2342 (0.3496)	0.14853 (0.5564)
DigN8	0.33923 (0.0171)	0.37215 (0.0085)	0.34991 (0.0137)	0.40905 (0.0035)

DM = Nedbrutt tørrstoff for 24, 48 og 96 timer, DDM = Beregnet nedbrytningsgrad av løselig- og potensielt nedbrytbart tørrstoff, DigDM8 = Beregnet nedbrytningsgrad av tørrstoff *in sacco* i vom med 8 % passasjehastighet, NDF Nedbrutt NDF for 24, 48 og 96 timer inkubasjon *in sacco*, BNDF = Beregnet nedbrytningsgrad av potensielt fordøyelig NDF, DigNDF3= Beregnet nedbrytningsgrad av NDF *in sacco* med 3 % passasjehastighet fra vom, N = Nedbrutt nitrogen for 24, 48 og 96 timer inkubasjon, DigN8 = Beregnet nedbrytningsgrad av nitrogen *in sacco* i vom med 8 % passasjehastighet.

Figur 20 viser spredningspott mellom DDM og *in vivo* apparent fordøyelighet for organisk stoff (*in_vivo_org*) og figur 21 viser spredningsplott mellom nedbrytningsgraden av NDF for 48 timer *in sacco* (NDF48) og *in vivo* apparent fordøyelighet av NDF (*in_vivo_NDF*).



Figur 20. Spredningsplott av den beregnede nedbrytningsgraden av løselig- og potensielt nedbrytbart tørrstoff *in sacco* (DDM) og *in vivo* apparent fordøyelighet for organisk stoff (*in_vivo_org*). $\diamond/1$ = lavt innhold av NDF, $\square/2$ = middels innhold av NDF, $\bullet/3$ = Høyt innhold av NDF.



Figur 21. Spredningsplott av den beregnede nedbrytningsgraden potensielt nedbrytbart NDF *in sacco* (DDM) og *in vivo* apparent fordøyelighet av NDF (*in_vivo_NDF*). $\diamond/1$ = lavt innhold av NDF, $\square/2$ = middels innhold av NDF, $\bullet/3$ = Høyt innhold av NDF.

4.2.7 Prediksjon av *in sacco* og *in vivo* parametere

Dette kapitelet viser utforming av formler for å kunne predikere fordøyeligheten av *in sacco* og *in vivo* fordøyelighet med *in vitro* metodene.

Nedbrytningsgraden av TS og NDF for *in sacco* korrelerte signifikant ($P < 0.05$) med DaisyDM48, GASA16 og mengde iNDF i fôrvaren, det samme gjorde også iNDF, GASA16, DaisyDM96 og DDM for *in vivo* apparent fordøyelighet av TS og organisk stoff. Tabell 12 viser prediksjonsligninger for de ulike nedbrytnings og fordøyelighetsparameterne (DigDM8, DigNDF3, *in vivo* ts og *in vivo* org).

Tabell 12. Prediksjonsligninger for nedbrytningsgrad av tørrstoff (DM) og NDF for *in sacco* DigDM8 og DigNDF3, og for *in vivo* apparent fordøyelighet for tørrstoff (TS) og organiskstoff (org).

Ligning	R ²	MSE	Sikkerhet
DigDM8 = 6.98 + 0.85(DaisyDM48)	0.82	9.9	<.0001
DigDM8 = 58 + 0.09(GASA16) -0.74(iNDF)	0.70	17.0	<.0001
DigNDF3 = 0.68(DaisyDM48) + 13.3	0.63	18.0	<.0001
<i>In vivo</i> org = 88.7 - 0.67(iNDF) - 0.0073(GASA16)	0.54	17.0	<.0001
<i>In vivo</i> org = 62.6 + 0.31(DaisyDM96) - 0.4(iNDF)	0.56	15.2	<.0001
<i>In vivo</i> org = 9.06 + 0.78(DDM)	0.51	16.5	<.0001
<i>In vivo</i> ts = 58.7 + 0.32(DaisyDM96) - 0.40(iNDF)	0.52	18.6	<.0001
<i>In vivo</i> ts = 4.06 + 0.80(DDM)	0.47	20.1	<.0001
<i>In vivo</i> ts = 88.4 - 0.89(iNDF)	0.60	19.9	<.0001

Ufordøyelig NDF (iNDF) ble benyttet sammen med *in vitro* metodene, det ble også satt sammen en modell med bare iNDF for å undersøke hvor mye av variasjonen den utgjorde alene (60 %). Den beste *in vitro* metoden for å beskrive *in sacco* metoden var Daisy^{II} som beskrev 82 % av variasjonen for DigDM8. For *in vivo* apparent fordøyelighet av TS og organisk stoff beskrev *in vitro* metodene ikke mer en opp mot 56 % av variasjonen.

5.0 Diskusjon

Tilgjengeligheten av næringsstoffene i de undersøkte fôrene er i første omgang bestemt av deres kjemiske sammensetning. I denne sammenhengen spiller innholdet av tilgjengelige og utilgjengelige komponenter en viktig rolle, men også struktur og naturlige fordøyelseshemmende komponenter som er til stede i fôrvaren har betydning (Gjefsen, 2016). Fôrene ble kategorisert innen lavt, middels og høyt innhold av NDF med forventning om høyere fordøyelse ved lavt enn ved høyt innhold av NDF. De ulike metodene ser ut til å gi en forventet fordøyelse for de forskjellige nivåene av NDF. Ved Daisy^{II} ble det funnet høyest TS- og NDF tap for fôrene med lavest innhold av NDF. *In sacco* metoden ga relativt like svar som Daisy^{II}. Årsaken er sannsynligvis at gruppen med lavt innhold av NDF er høstet ved et tidligere utviklingsstrinn, noe som gir lavere lignifiseringsgrad og dermed høyere fordøyelighet. Det fraksjonelle gjæringsmønsteret (Figur 8a) bekrefter forskjellene mellom de tre gruppene. Den fraksjonelle gjæringskurven påvirkes i all hovedsak av forholdet mellom løselige substrater og tungt fordøyelige materiale, som kan beskrives av planteart, morfologisk utviklingsstadium og ensileringsmetode som også er med på å påvirke hvor lett mikrobene fester seg til partiklene som skal fermenteres (Groot et al., 1996; McAllister et al., 1994). Løselige materiale i fôret krever ikke kolonisering av mikrobene for å komme i gang med fermenteringen, dette fører til at nedbrytningen går raskere fordi mikrobene ikke behøver å kolonisere overflaten av partikkelen (Groot et al., 1996). Høyt innhold av tungt fordøyelig celleveggmateriale fører til en lavere fraksjonell gjæringskurve, i tillegg til at den flater ut noe tregere (Groot et al., 1996).

Fôrprøvene for *in sacco* ble malt på 1.5 mm sold, mens hos Daisy^{II} og iGP ble de malt på 1.0 mm sold. Maling på 1.0 mm sold vil gi økt finhetsgrad sammenlignet med maling på 1.5 mm sold. Fôrets nedbrytningsgrad tenderer å øke ved økt finhetsgrad (Nozière & Michalet-Doreau, 2000), da redusert partikkelstørrelse fører til økt total overflate eksponert for mikrobiell nedbrytning. I tillegg er det antatt at økt finhetsgrad kan øke partikkeltapet (Michalet-Doreau & Ould-Bah, 1992). Lindberg og Knutsson (1981) testet effekten av porestørrelse på tap av ufordøyd materiale for to grovfôrprøver malt for å passere sold på 1.0 mm og 4.5 mm åpning. Resultatene viste at tap av materiale var mer enn det dobbelt for 1.0 mm enn for 4.5 mm. Samme tendens funnet i flere undersøkelser (Damiran et al., 2008; Richards et al., 1995). Wilman og Adesogan (2000) testet fôrprøver malt på 0.5, 1.0 og 1.5 mm sold og fant ingen signifikant effekt av malingsgrad. Soldstørrelse vil dermed kunne antas å ha en innvirkning på faktisk malingsgrad, og særlig ved store forskjeller mellom

partikkelstørrelsen, men ved lavere differanse (0.5 – 1.0 mm) vil det ha mindre betydning for resultatet. Den faktiske partikkelstørrelsen etter maling kan variere etter innhold av NDF i fôrvaren og mellom ulike plantearter. Det kan dermed være stor variasjon og for å fastslå den faktiske partikkelstørrelsen burde den måles (Michalet-Doreau & Ould-Bah, 1992). Ettersom dette er tidkrevende og vanskelig, så er det enklere å holde seg til størrelse på sold, men ved stor variasjon innen plantemateriale bør aktsomhet ytes.

Partikkeltapet ved de tidligste inkubasjonstidene for Daisy^{II} og *in sacco* var betydelig, opp mot 40 % for tørrstofftap. Dette er med på å øke faren for overestimering av nedbrytningsgraden for disse metodene (Wilman et al., 1996). Partikkeltapet forekommer under inkubasjon i løsning eller ved vasking av posene. Partikkeltapet øker med økt porestørrelse og redusert partikkelstørrelse (Lindberg & Knutsson, 1981; Lindberg, 1981). Overestimering av løselig fraksjon kan også forekomme da lav partikkelstørrelse kan føre til at ikke-nedbrutte partikler forsvinner ut gjennom porene og videre ut fra vomma (Nozière & Michalet-Doreau, 2000). Mabweesh et al. (2000) testet fôrprøver malt for å passere 2 mm sold og konkluderte med at økt partikkelstørrelse i forhold til hva de testet for Daisy^{II} kunne virke positivt inn på å redusere partikkeltap fra posene.

Størrelsen på poren er viktig med tanke på miljøet inne i posen sammenlignet med utenfor, og da særlig med hensyn til at porene ikke favoriserer enkelte mikrober framfor andre (Nozière & Michalet-Doreau, 2000). Like viktig er det at materiale inne i posen også har god tilgang på buffer for å holde jevn pH. Porestørrelsen kan være med på å påvirke hvilke type mikrober som kommer seg lettest gjennom, og etablerer seg inne i posen. Lindberg et al. (1984) oppdaget høyere mikrobiell aktivitet inne i poser med 40 µm sammenlignet med en porestørrelse på 20 µm, dette gjaldt særlig aktiviteten til protozoer. Men også den mikrobielle populasjonen varierer fra utsiden til innsiden av posen, og da særlig de cellulolytiske bakteriene (Meyer & Mackie, 1986). Dette kan forklares av at utviklingspotensialet mellom medier inne i posen er mer begrenset, og avhenger i større grad av innholdet i posen enn posens totale overflate, som har en betydning for pH i posen (Lindberg et al., 1984; Nozière & Michalet-Doreau, 2000). Dette kan føre til at pH i posen er lavere inne i den sammenlignet med utsiden av posen flyktige fettsyrer akkumulerer inne i posen (Marinucci et al., 1992). Ettersom det er forskjellige porestørrelsen for posene benyttet for *in sacco* og Daisy^{II}, kan man forvente at dette kan være med på å utgjøre en forskjell i nedbrytningsgraden mellom de to metodene.

Forholdet mellom prøvemengde og overflaten på posen er med på å påvirker nedbrytningsgraden. Flere studier viser til at redusert prøvemengde i forhold til posens overflate øker nedbrytningsgraden (Udén & Van Soest, 1984; Van Hellen & Ellis, 1977), men økt nedbrytningsgrad kan også komme av at høyere andel blir vasket ut og gir dermed en overestimering av nedbrytningsgraden (Damiran et al., 2008). Evaluering av ulike undersøkelser har vist en negativt lineær sammenheng mellom prøvestørrelse og posens overflate (Vanzant et al., 1998). For Daisy^{II} hevder ANKOM-Technology (2017) at prøvemengden bør ligge mellom 0.25 – 0.50 g, som tilsvarer 6.25 – 12.5 mg/cm², mens for *in sacco* anbefales 10 mg/cm² (Åkerlind et al., 2011). I denne oppgaven ble det for Daisy^{II} benyttet 25 mg/cm², som tilsvarer 1 gram prøve per pose. Dette ble gjort for å sikre tilstrekkelig med rester etter inkubasjon for analyse, da antallet replikater hadde måtte vært nesten det dobbelte å sikre nokk materiale til analyse for de lengste inkubasjonstidene. For *in sacco* ble det benyttet 2 gram per pose som tilsvarer 12-13 mg/cm². Nedbrytningsgraden for Daisy^{II} er noe lavere enn for *in sacco* og *in vivo*, noe som kan ha en sammenheng med mengde prøve i forhold til posens overflate.

Ved beregning av nedbrytningsgraden av fôrvaren etter Ørskov og McDonald (1979) for *in sacco* ble det prøvd ulike passasjehastigheter for tørrstoff, organisk stoff og nitrogen (3, 5 og 8 %/t). Best korrelasjon ga 8 %/t sammenlignet med de andre fordøyelighetsmetodene. For NDF ga 3 %/t høyest korrelasjon. Ved sammenligning av *in sacco* og *in vivo* resultater bør en yte forsiktighet da det kan forekomme forskjeller mellom dyreart, da passasjehastighet og fôrenes nedbrytningsgrad kan variere, og det gjelder særlig passasje av væskefraksjonen (Colucci et al., 1990).

5.1 Sammenligning av metodene

Sammenligning av metodene viser at *in sacco* og Daisy^{II} er de to metodene som korrelerer best med *in vivo* fordøyelighet. For *in sacco* var korrelasjonen høyest mellom beregnet nedbrytningsgrad av potensielt nedbrytbart NDF (BNDF) og apparent fordøyelighet av NDF ($r=0.74$). Høy korrelasjon var det også mellom *in vivo* og totalfordøyelighet av tørrstoff (DDM) og ($r=0.71$). Høy korrelasjon mellom *in vivo* fordøyelighet for TS og organisk stoff med nedbrytningsgraden av NDF for *in sacco* indikerer at en stor andel av tørrstoffet består av NDF. For de beregnede fordøyelighetsparameterne DigDM og DigNDF underestimeres nedbrytningsgraden i forhold til *in vivo* fordøyelighet (DigDM vs. *In vivo* TS= 51.7 vs. 70.2 %). Årsaken til underestimering av *in sacco* verdiene kan være på grunn av feilestimering av nedbrytningshastigheten til fôrvaren (Madsen et al., 1994; Nozière & Michalet-Doreau,

2000). Derimot reflekterer de målte nedbrytningsverdiene for *in sacco* fordøyeligheten *in vivo* bedre. Den mikrobielle aktiviteten inne i posen som tidligere diskutert, trenger nødvendigvis ikke å avvike fra utsiden i like stor grad som først antatt. Men likheten i fordøyelighet kan like gjerne komme av overestimert av fordøyeligheten i form av partikkeltap (Van Soest, 2018). For TS, NDF og nitrogen inkubert 24, 96 og 16 timer *in sacco* var den målte nedbrytningsgraden 68.9, 77.5 og 76.2 %. *In vivo* fordøyelighet for de samme parameterne var 70.3, 77.0 og 74.8 %.

Korrelasjon mellom *in vivo* og Daisy^{II} var på samme nivå som hos *in sacco*. Høyest korrelasjon var mellom DaisyDM96 og nedbrytningsgraden for organisk stoff *in vivo* ($r = 0.69$). Derimot var det stor forskjell mellom nedbrytningsgraden av NDF for de ulike fôrene sammenlignet med *in vivo* fordøyelighet. Gjennomsnittlig nedbrytningsgrad for DaisyNDF96 var 44.5 %, sammenlignet med *in vivo* fordøyelighet som var 76.8 % ($r = 0.62$). Men for TS var nedbrytningsgraden i høyere grad sammenlignbar (63.3 % vs. 70.3 %, $r = 0.67$).

Det at Daisy^{II} og *in sacco* korrelerer ganske likt med *in vivo* er positivt da Daisy^{II} er relativt enkel å gjennomføre. Metoden er effektiv sammenlignet med andre metoder da 100 prøver kan inkuberes samtidig. Den krever ingen form for avansert utstyr, med unntak fra tilgang til vomsaft. En ulempe med Daisy^{II} er at prøvene som inkuberes samtidig inne i ett inkubasjonsglass vil kunne yte en effekt på hverandre. En slik effekt vil kunne medføre at nedbrytningsgraden av samtlige prøver kommer nærmer en gjennomsnittsverdi. Årsaken til dette er at fôrenes kjemiske sammensetning kan være med på å påvirke den mikrobielle populasjonen i glasset (Wilman & Adesogan, 2000). Det antas at dette har størst effekt ved forsøk med stor differanse i kjemisk sammensetning mellom de ulike fôrslagene testet (Wilman & Adesogan, 2000). I dette forsøket var majoriteten av prøvene av typiske nordiske grasarter, med lik konserveringsmetode, med unntak av fôr 172 som var maissurfôr og 173-176 som var halm. Det antas dermed at den mikrobielle populasjonen i de forskjellige inkubasjonsglassene i lav grad ble påvirket av differensierte fôrprøver. I tillegg vil graden av løselige materiale i prøvene være med på å påvirke nedbrytningsgraden av celleveggstoffer for alle prøvene i samme inkubasjonsglass (Wilman & Adesogan, 2000). Fordøyeligheten av NDF hos Daisy^{II} var relativt lav sammenlignet med *in vivo*, men derimot ble nedbrytningsgraden rangert i samsvar med *in vivo* som ga en korrelasjon på 0.62. Dette indikere at metoden kan være nyttig for å sammenligne nedbrytningspotensiale i forskjellige fôrvarer for NDF.

Nedbrytningen av NDF for *in sacco* ser ut til å starte kjappere enn hos Daisy^{II}. Trujillo et al. (2010) foreslår at ulikheter mellom disse to metodene kan føre til et større partikkeltap ved *in sacco* metoden, og at dette kan komme av at *in sacco* posene blir utsatt for større fysisk påkjenning av vomkontraksjoner sammenlignet med rotasjonen i inkubasjonsglassene for Daisy^{II}. Differansen i porestørrelse kan også i denne sammenhengen utøvd en effekt på hvor raskt fiberpartiklene forlot posen (Van Soest, 2018). Ved høyere fysisk påkjennelse og større porestørrelse ved *in sacco* kan det tenkes at disse to faktorene sammen kan utøvd en stor forskjell mellom disse to metodene, og en standardisering av porestørrelse mellom disse to metodene ville gitt klarere svar. Høyere nedbrytningsverdier for *in sacco* enn for hos Daisy^{II} kan også forklares av en høyere konsentrasjon av mikroorganismer i vomma til vertedyret under *in sacco* sammenlignet med inkubasjonsglasset for Daisy^{II} (Chaudhry & Mohamed, 2011). I vomma vil det jevnlig tilføres nye næringsstoffer som er lettere tilgjengelige for mikrobene, da kyrne ble føret to ganger daglig. Dette vil dermed kunne gi høyere grad av fermentering for prøver inkubert over lengere tid. En annen kilde til variasjon er ved uttak av vomvæske til bruk i *in vitro* metodene. Kong et al. (2010) så på variasjon i etableringen av mikrobielle kulturer i ulike deler av vomma, og fant at de ulike delene av vomma har differensiert konsentrasjon av de forskjellige mikrobene. En mulig feilkilde som kan oppstå ved innhenting av vomvæske er at prøvetaker ikke i tilstrekkelig grad får ut et representativt utvalg av mikrober fra vomma, og dermed kan være med på å redusere nedbrytningsgraden for *in vitro* metodene. Under gjeldende forsøk ble det ekstrahert 3 x 200 ml fra hver av de tre vertskyrne, hvor vomvæsken ble ekstrahert fra tre forskjellige steder; nettmagen, senter av vom og i bakre del av vom.

In vitro gassproduksjon (iGP) har ikke samme målemetode av fordøyelighet som de andre metodene, men relaterer i samme grad til nedbrytningen av fôrprøvene. Korrelasjonen mellom iGP, *in sacco* og Daisy^{II} ser ut til å generelt være høyest for gass produsert etter 16, 24 og 48 timer inkubasjon sammenlignet med 72 timers inkubasjon, i motsetning til Kamalak et al. (2005) som fant høyere korrelasjon ved lengere inkubasjonstid. Høyest korrelasjon for iGP mellom de ulike metodene testet var med *in sacco* metoden ($r = 0.78$). For *in sacco* er det høy korrelasjon for TS nedbrytning etter 16 timer iGP, mens nedbrytningsgraden for NDF *in sacco* korrelerer best etter 24 timers iGP ($r = 0.71$). For iGP og *in vivo* parameterne er det derimot lav korrelasjon, med høyest for GASA16 ($r = 0.46$). Det er likevel signifikant sammenheng ($P < 0.0001$) mellom flere av de ulike inkubasjonstidene for iGP med *in vivo*, men ikke over $r = 0.46$ (Tabell 10). Det at iGP korrelerer såpass godt med *in sacco* er positivt,

da *in sacco* metoden er arbeidskrevende og krever tilgang til vomfistulerte forsøksdyr. Gassproduksjonssystemet er et relativt effektivt system som kan teste mange prøver på en gang i et kontrollert miljø i tillegg til at det er billigere.

Gassproduksjonen er hovedsakelig et resultat av fermenteringen av karbohydrater, hvor mesteparten av gassproduksjonen har funnet sted innenfor de første 24 timene. Fôr med lavere innhold av NDF oppnår høyere gassproduksjon i starten og kortere tid til hvor halvparten av den totale gassmengden er blitt produsert (B). Nedbrytningskarakteristika for NDF er som beskrevet tidligere aldersbestemt. Ved senere morfologisk utviklingstrinn reduseres dermed NDF fordøyelighet, og lengere inkubasjonstid kreves for å oppnå B (Groot et al., 1996; Nordheim-Viken & Volden, 2009). Dette beskriver den høye negative korrelasjonen mellom GASB verdiene og de andre metodene ($r = -0.38 - -0.69$) da redusert GASB gir økt fordøyelighet. Innhold av lettløselige stoffer spiller en viktig rolle i hvor raskt fermenteringen kommer i gang og når sin maksimale kapasitet. Etter Groot et al. (1996) beskrives tiden fra inkubasjonens start til størrelsen av den mikrobielle populasjonen ikke lengere begrenser fermenteringshastigheten som R_M . Lengden på denne fasen inneholder en del informasjon om tilgjengeligheten til næringsstoffene. Dette betyr at kort tidsintervall (16-24 t) forklarer nedbrytningsgraden best, og særlig ved høyt innhold av løselige partikler, som surfôr har. Lav korrelasjon for iGP 72 timer kommer av at kurven har flatet ut og inneholder dermed lite informasjon om tilgjengeligheten av næringsstoffene. Etter 72 timer vil to forskjellige prøver kunne ha helt identisk mengde gass produsert, men formen på kurven kan være helt forskjellig.

En utfordring ved bruk av fiber/nylonpose metoder for nedbrytning ved undersøkelse av nedbrytningsgraden av nitrogen er at substrater lett forsvinner ut fra posen, og egner seg dårlig hvis innholdet av løselige proteiner er høyt. Årsaken til dette er at det er lett å overestimere nedbrytningsgraden av denne fraksjonen da mange løselige proteiner er motstandsdyktig mot nedbrytning i vomma (Nugent et al., 1983). Et annet problem er mikrobiell kontaminering som kan forårsaker underestimering av protein nedbrytningen. Dette er mikrober som er igjen på fôrprøven etter at posene er ferdig inkubert. Mikrobiell kontaminering er et større problem ved fôrvarer som generelt inneholder lite protein (Wanderley et al., 1993). I denne oppgaven korrelerte nedbrytningsgraden av nitrogen hos målt nedbrytningsgrad *in sacco* 24 t (N24) med *in vivo* best ($r = 0.47$). Ettersom majoriteten av fôrene benyttet var surfôr, konserverte i rundballer ble det forventet at en stor andel løselige proteiner i form av aminosyrer, korte peptider, ammoniakk, amider, aminer og lignende

(Harstad, 2016). Innhold av løselige proteiner og andre NPN fraksjoner i surfôr varierer normalt, og varierer særlig ved TS-innhold og ensileringsprosess. En del av nedbrytningen av proteinet er unngåelig da planteproteaser spalter proteiner i plantematerialet under fortørkingen og første del av ensileringen. Mikroorganismer i siloen vil kunne øke faren for spaltning av proteiner. Rask senkning av pH, i tillegg til at temperaturen blir holdt lav er med på å dempe spaltningen av proteinet (Harstad, 2016).

Datamaterialet ga ikke grunnlag for å konstruere gode prediksjonsligninger til prediksjon av *in vivo* apparent fordøyelighet. Høyest R^2 ble beregnet ved å bruke DaisyDM96 og iNDF (0.56) for å predikere *in vivo*. Fôr som lå langt utenfor regresjonslinjen, såkalte uteliggere, ble også prøvd fjernet uten at dette bedret R^2 noe nevneverdig. Ved å benytte kjemiske komponenter av fôrvaren sammen med *in vitro* metodene, slik som iNDF, økte sikkerheten. Derimot kan repeterbarheten blir lavere ved å ta med flere variabler i formlene. Høy beskrivelse av variasjonen ble beregnet mellom Daisy^{II} og *in sacco*, $R^2 = 0.82$. Regresjonsligningen viser at Daisy^{II} har et godt utgangspunkt for å kunne estimere *in sacco*. Forskjeller mellom partikkelstørrelse, porestørrelse og prøve mengde i forhold til posen overflate er faktorer som regnes å kunne spille en rolle for variasjon mellom de ulike metodene, og med fordel skulle ha blitt justert slik at de i høyere grad var sammenlignbar.

6.0 Konklusjon

For metoder som inkluderer bruk av nylon/fiber poser til fordøyelsesforsøk er det viktig at prosedyrene standardiseres, da inntrykket er at det er en stor variasjon innen prøvens størrelse i forhold til posens overflate, porestørrelse og malingsgrad av fôrprøver. En generell anbefaling er at forholdet mellom posens overflate og prøvens mengde ligger mellom 10-20 mg/cm². En annen utfordring som angår Daisy^{II} er usikkerheten rundt påvirkningen de forskjellige prøvene inkubert samtidig har på hverandre. Daisy^{II} underestimerer fordøyeligheten for TS og NDF sammenlignet med *in sacco* og *in vivo*, men har relativt god korrelasjon med de nevnte metodene. Dette antyder at Daisy^{II} potensielt kan være nyttig for å sammenligne nedbrytningsgraden for ulike fôrprøver, særlig med tanke på at den er kjappere og enklere å gjennomføre. Når det gjelder iGP hadde den relativt lav korrelasjon med *in vivo* fordøyelighet og egnet ikke i samme grad som Daisy^{II}. Derimot egner iGP seg bedre for å predikere *in sacco*.

Resultatene tyder på at metodene til en viss grad kan estimere *in vivo* fordøyelighet hos drøvtyggere, men er ikke presise nok for å gi gode nok prediksjonsligninger. Det er derfor nødvendig med videre undersøkelser for å se på hvilke faktorer som påvirker variasjonen hos de undersøkte metodene.

7.0 Referanser

- Adler, S., Steinshamn, H., Thuen, E., Jensen, S. K. & Hansen-Møller, J. (2011). Hydrogenering av fettsyrer i vomma-effekt av botanisk sammenstening av surfôret. *Husdyrforsøksmøtet 2011*: 13-16.
- Allen, M. S. (1996). Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *Journal of Animal Science*, 74 (12): 3063-3075.
- ANKOM-Technology. (2017). *In Vitro True Digestibility using the DAISY^{II} Incubator*: ANKOM Technology. Tilgjengelig fra: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_3_Invitro_D200_D200I.pdf.
- ANKOM-Technology. (2018). *Operator's Manual*. Tilgjengelig fra: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/RF_Manual.pdf (lest 30.09.20).
- Balasko, J. A., & Nelson, J. (2003). Grasses for Northern Areas I: *Forages. Volume 1: An introduction to grassland agriculture*, s. 125-148.
- Berg, M. B. (2018a). Beskrivelse av arbeid - Tørrstoff. Ås: *Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap, NMBU*.
- Berg, M. B. (2018b). Beskrivelse av metode - aNDFom. Ås: *Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap, NMBU*.
- Berg, M. B. (2018c). Beskrivelse av metode - CHNS (Dumas/total-N). Ås: *Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap, NMBU*.
- Cardoza, R. & Mertens, D. (1986). Effect of fiber source and content on threshold size for passage and fecal particle distribution. *J. Dairy Sci*, 69 (Suppl 1): 134.
- Chaudhry, A. S. & Mohamed, R. A. (2011). Using fistulated sheep to compare *in sacco* and *in vitro* rumen degradation of selected feeds. *Animal Production Science*, 51 (11): 1015-1024.
- Collins, M. & Fritx, J. O. (2003). Forage Quality I: b. 1 *Forages. Volume 1: An introduction to grassland agriculture*, s. 363-390.
- Colucci, P., Macleod, G., Grovum, W., McMillan, I. & Barney, D. (1990). Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *Journal of dairy science*, 73 (8): 2143-2156.
- Cornou, C., Storm, I. M. D., Hindrichsen, I. K., Worgan, H., Bakewell, E., Ruiz, D. R. Y., Abecia, L., Tagliapietra, F., Cattani, M. & Ritz, C. (2013). A ring test of a wireless *in vitro* gas production system. *Animal Production Science*, 53 (6): 585-592.
- Da Silva, J. C., Seeley, R., Beever, D., Prescott, J. & Armstrong, D. (1972). The effect in sheep of physical form and stage of growth on the sites of digestion of a dried grass: 2.* Sites of nitrogen digestion. *British Journal of Nutrition*, 28 (3): 357-371.

- Damiran, D., DelCurto, T., Bohnert, D. & Findholt, S. (2008). Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets. *Animal Feed Science and Technology*, 141 (1-2): 15-35.
- De Boever, J., Cottyn, B., Andries, J., Buysse, F. & Vanacker, J. (1988). The use of a cellulase technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of forages. *Animal Feed Science and Technology*, 19 (3): 247-260.
- Ekern, A. (1993). Nytt system for energivurdering av fôr til drøvtyggere.
- Elgersma, A., Ellen, G., Van der Horst, H., Muuse, B., Boer, H. & Tamminga, S. (2003). Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected by cultivar and regrowth interval. *Animal Feed Science and Technology*, 108 (1-4): 191-205.
- Faichney, G. (1975). The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants.
- France, J. & Dijkstra, J. (2005). Volatil Fatty Acid Production. I: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, s. 157-176.
- Getachew, G., Robinson, P., DePeters, E. & Taylor, S. (2004). Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 111 (1-4): 57-71.
- Gjefsen, T. (2016). *Fôringslære*. 3 utg.
- Goering, Keith, H., Soest, V. & J., P. (1970). *Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications*: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Goldman, A., Genizi, A., Yulzari, A. & Seligman, N. (1987). Improving the reliability of the two-stage in vitro assay for ruminant feed digestibility by calibration against in vivo data from a wide range of sources. *Animal Feed Science and Technology*, 18 (3): 233-245.
- Grant, R., Van Soest, P. & McDowell, R. (1974). Influence of rumen fluid source and fermentation time on in vitro true dry matter digestibility. *Journal of Dairy Science*, 57 (10): 1201-1205.
- Groot, J. C., Cone, J. W., Williams, B. A., Debersaques, F. M. & Lantinga, E. A. (1996). Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 64 (1): 77-89.
- Harstad, O. (2018). *Fôropptak og regulering*: Norges Miljø og Biovitenskapelige Universitet. Upublisert manuskript.
- Harstad, O. M. (1994). *Fôrmiddelvurdering og fôrutnyttelse hos drøvtyggere*. Ås: Landbruksbokhandelen.
- Harstad, O. M. (2016). *Grovfôr*.
- Holden, L. A. (1999). Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of dairy science*, 82 (8): 1791-1794.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y. & Ozay, O. (2005). Comparison of in vitro gas production technique with in situ nylon bag technique to estimate dry matter degradation. *Czech Journal of Animal Science*, 50 (2): 60-67.

- Kelley, C. L., Komarek, R. J. & Komarek, A. R. (2016). *In Vitro and Chemical Determination of Fibre and Digestibility of common European Feedstuffs Using the ANKOM Fibre Analyzer and the ANKOM Daisy In Vitro Incubator*.
- Kitessa, S., Irish, G. & Flinn, P. (1999). Comparison of methods used to predict the in vivo digestibility of feeds in ruminants. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50 (5): 825-842.
- Kong, Y., Teather, R. & Forster, R. (2010). Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS microbiology ecology*, 74 (3): 612-622.
- Kristensen, N. B., Misciattelli, L., & Danfær, A. (2003). Næringsstoffernes absorption og tilgængelighed for de perifere væv. I: Ministeriet for Fødevarer, L. o. F. (red.) *Kvægets ernæring og fysiologi - Bind 1*, s. 389-411: Danmarks JordbrugsForskning.
- Krizsan, S., Ahvenjärvi, S. & Huhtanen, P. (2010). A meta-analysis of passage rate estimated by rumen evacuation with cattle and evaluation of passage rate prediction models. *Journal of dairy science*, 93 (12): 5890-5901.
- Lindberg, J. & Knutsson, P. (1981). Effect of bag pore size on the loss of particulate matter and on the degradation of cell wall fibre. *Agriculture and Environment*, 6 (2-3): 171-182.
- Lindberg, J., Kaspersson, A. & Ciszuk, P. (1984). Studies on pH, number of protozoa and microbial ATP concentrations in rumen-incubated nylon bags with different pore sizes. *The Journal of Agricultural Science*, 102 (2): 501-504.
- Lindberg, J. E. (1981). The effect of basal diet on the ruminal degradation of dry matter, nitrogenous compounds and cell walls in nylon bags. Roughage and cereals in various proportions.
- Mabjeesh, S., Cohen, M. & Arieli, A. (2000). In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *Journal of dairy science*, 83 (10): 2289-2294.
- MacAdam, J. W. & Nelson, C. J. (2003). Physiology of Forage Plants. I: b. 1 *Forages - An introduction to grassland agriculture*, s. 73-97.
- Madsen, J., Stensig, T., Weisbjerg, M. R. & Hvelplund, T. (1994). Estimation of the physical fill of feedstuffs in the rumen by the in sacco degradation characteristics. *Livestock Production Science*, 39 (1): 43-47.
- Madsen, J., Hvelplund, T., Weisbjerg, M. R., Bertilsson, J., Olsson, I., Spörndly, R., Harstad, O. M., Volden, H., Tuori, M. & Varvikko, T. (1995). The AAT/PBV protein evaluation system for ruminants: a revision.
- Marinucci, M. T., Dehority, B. & Loerch, S. (1992). In vitro and in vivo studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. *Journal of animal science*, 70 (1): 296-307.
- Marten, G. C. & Barnes, R. F. (1979). Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. I: *Standardization of analytical methodology for feeds: proceedings...* IDRC, Ottawa, ON, CA.
- Maxin, G., Ouellet, D. & Lapierre, H. (2013). Ruminal degradability of dry matter, crude protein, and amino acids in soybean meal, canola meal, corn, and wheat dried distillers grains. *Journal of dairy science*, 96 (8): 5151-5160.

- McAllister, T., Bae, H., Jones, G. & Cheng, K.-J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of animal science*, 72 (11): 3004-3018.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A., & Wilkinson, R.G. (2010). *Animal Nutrition*.
- McLeod, M. & Minson, D. (1969). Sources of variation in the in vitro digestibility of tropical grasses. *Grass and Forage Science*, 24 (3): 244-249.
- Mehrez, A. & Ørskov, E. (1977). A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*, 88 (3): 645-650.
- Menke, K. H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal research and development*, 28: 7-55.
- Meyer, J. & Mackie, R. I. (1986). Microbiological evaluation of the intraruminal in sacculus digestion technique. *Applied and environmental microbiology*, 51 (3): 622-629.
- Michalet-Doreau, B. & Ould-Bah, M. (1992). In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 40 (1): 57-86.
- Moore, K., Moser, L. E., Vogel, K. P., Waller, S. S., Johnson, B. & Pedersen, J. F. (1991). Describing and quantifying growth stages of perennial forage grasses. *Agronomy Journal*, 83 (6): 1073-1077.
- Mooser, L. E. & C.J., N. (2003). Structure and Morphology of Grasses. I: b. 1 *An introduction to grassland agriculture*, s. 25-50.
- Nocek, J. E. (1988). In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *Journal of Dairy Science*, 71 (8): 2051-2069.
- Nordheim-Viken, H. & Volden, H. (2009). Effect of maturity stage, nitrogen fertilization and seasonal variation on ruminal degradation characteristics of neutral detergent fibre in timothy (*Phleum pratense* L.). *Animal Feed Science and Technology*, 149 (1-2): 30-59.
- Nozière, P. & Michalet-Doreau, B. (2000). In sacco methods. *Farm animal metabolism and nutrition*: 233-254.
- Nugent, J., Jones, W., Jordan, D. & Mangan, J. (1983). Rates of proteolysis in the rumen of the soluble proteins casein, Fraction I (18S) leaf protein, bovine serum albumin and bovine submaxillary mucoprotein. *British Journal of Nutrition*, 50 (2): 357-368.
- Pell, A. & Schofield, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of dairy science*, 76 (4): 1063-1073.
- Petit, H. & Tremblay, G. (2007). Determination of protein degradability and its importance in ruminant nutrition. I: Ling, J. R. (red.) *Dietary Protein Research Trends*, s. 137-148: Nova Biomedical.
- Poppi, D., Norton, B., Minson, D. & Hendricksen, R. (1980). The validity of the critical size theory for particles leaving the rumen. *The Journal of Agricultural Science*, 94 (2): 275-280.
- Prestløkken, E. (1994). Betydning av proteinkvalitet i fôr til drøvtyggere. *Folk & Fø*.
- Prestløkken, E., Randby, Å., Eknæs, M. & Garmo, T. (2011). Nedbrytnings- og passasjehastighet for fiber i grassurfôr høstet ved tidlig og normalt utviklingstrinn.

- Richards, C., Pedersen, J. F., Britton, R., Stock, R. & Krehbiel, C. (1995). In vitro starch disappearance procedure modifications. *Animal feed science and technology*, 55 (1-2): 35-45.
- Russell, J. & Strobel, H. (2006). Microbial Energetics*. I: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, s. 229 - 310.
- Sjaastad, Ø. V., Sand, O. & Hove, K. (2016). *Physiology of Domestic Animals*: Scandinavian Veterinary Press.
- Stensig, T., Weisbjerg, M. R. & Hvelplund, T. (1998). Evaluation of different methods for the determination of digestion and passage rates of fibre in the rumen of dairy cows. *Acta Agriculturae Scandinavica A—Animal Sciences*, 48 (3): 141-154.
- Stern, M. D., Bach, A. & Calsamiglia, S. (1997). Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *Journal of Animal Science*, 75 (8): 2256-2276.
- Sunding, P. (2013). *C4-Planter - botanikk*. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: https://snl.no/C4-planter_-_botanikk (lest 29.09.20).
- Sunding, P. (2020). *C3 planter - botanikk*: Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: https://snl.no/C3_planter_-_botanikk (lest 29.09.20).
- Tagliapietra, F., Cattani, M., Bailoni, L. & Schiavon, S. (2010). In vitro rumen fermentation: effect of headspace pressure on the gas production kinetics of corn meal and meadow hay. *Animal Feed Science and Technology*, 158 (3-4): 197-201.
- Theodorou, M., Lowman, R., Davies, Z., Cuddeford, D. & Owen, E. (1998). Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. *BSAP Occasional Publication*, 22: 55-63.
- Theodorou, M. & France, J. (2006). Rumen Microorganisms and their Interactions. I: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, s. 207 - 228.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 48 (3-4): 185-197. doi: 10.1016/0377-8401(94)90171-6.
- Tilley, J. & Terry, R. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and forage science*, 18 (2): 104-111.
- Tothi, R., Lund, P., Weisbjerg, M. R. & Hvelplund, T. (2003). Effect of expander processing on fractional rate of maize and barley starch degradation in the rumen of dairy cows estimated using rumen evacuation and in situ techniques. *Animal Feed Science and Technology*, 104 (1-4): 71-94.
- Trujillo, A., Marichal, M. d. J. & Carriquiry, M. (2010). Comparison of dry matter and neutral detergent fibre degradation of fibrous feedstuffs as determined with in situ and in vitro gravimetric procedures. *Animal feed science and technology*, 161 (1-2): 49-57.
- Udén, P. & Van Soest, P. J. (1984). Investigations of the in situ bag technique and a comparison of the fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. *Journal of Animal Science*, 58 (1): 213-221.
- UiO, I. f. b.-. (2011a). *Cellevegg*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/c/celleve.html> (lest 14.12.20).

- UiO, I. f. b.-. (2011b). *Lignin*. UiO: Institutt for biovitenskap. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/l/lignin.html> (lest 29.09.20).
- Van Hellen, R. & Ellis, W. (1977). Sample container porosities for rumen in situ studies. *Journal of Animal Science*, 44 (1): 141-146.
- Van Soest, P. (1967). Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *Journal of animal Science*, 26 (1): 119-128.
- Van Soest, P. J. (2018). *Nutritional ecology of the ruminant*: Cornell university press.
- Vanzant, E. S., Cochran, R. C. & Titgemeyer, E. C. (1998). Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of animal science*, 76 (10): 2717-2729.
- Volden, H., Harstad, O. M., Harstad, A., Stevnebø, A. & Schei, I. (2002). *Utvikling av et mekanisk system for vurdering av fôr til drøvtyggere - AAT-modellen*: Agropub. Tilgjengelig fra: <http://www.umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2002/51.pdf> (lest 08.12.20).
- Volden, H. (2011). Feed fraction characteristics. I: *NorFor - The Nordic feed evaluation system*, s. 33-40.
- Volden, H. & Larsen, M. (2011). Digestion and metabolism in the gastrointestinal tract. I: *NorFor - The Nordic feed evaluation system*, s. 59-80.
- Volden, H. & Larsen, M. (2011). Energy and metabolizable protein supply. I: *NorFor - The Nordic feed evaluation system*, s. 81 - 84.
- Volden, H. (2020). *Forelesning med professor Harald Volden ved NMBU* (15.01.20).
- Wanderley, R., Huber, J., Wu, Z., Pessaraki, M. & Fontes Jr, C. (1993). Influence of microbial colonization of feed particles on determination of nitrogen degradability by in situ incubation. *Journal of animal science*, 71 (11): 3073-3077.
- Wattiaux, M. (1994). Carbohydrate Metabolism in Dairy Cows. I: *Dairy Essentials, Babcock Institute* s. 9-12: Department of Dairy Science.
- Wattiaux, M. (1999). Lipid metabolism in dairy cows. I: *Dairy Essentials*, s. 13 - 16.
- Weisbjerg, M. & Hvelplund, T. (2003). Metoder til bestemmelse af kjemisk sammensætning og tilgængelighed. I: b. 53 *DJF rapport - Kvægets ernæring og fysiologi - Bind 1*, s. 69-86: Danmarks JordbrugsForskning.
- Weisbjerg, M., Lund, P. & Hvelplund, T. (2003). Kullhydrantomsætningen i mavetarmkanalen. I: *Kvægets ernæring og fysiologi Bind 1*, s. 239-280.
- Wilman, D., Foulkes, G. & Givens, D. (1996). A comparison of four methods of estimating the rate and extent of cell wall degradation in grass silages. *Animal feed science and technology*, 63 (1-4): 99-109.
- Wilman, D. & Adesogan, A. (2000). A comparison of filter bag methods with conventional tube methods of determining the in vitro digestibility of forages. *Animal feed science and technology*, 84 (1-2): 33-47.
- Wolin, M. J. (1960). A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43 (10): 1452-1459.
- Wood, C. & Badve, V. (2001). Recent developments in laboratory methods for the assessment of ruminant feeds. *BAIF Development Research Foundation, Pune, India and Natural Resources Institute, Catham, Kent (Science Booklet)*.

- Ørskov, E. & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92 (2): 499-503.
- Åkerlind, M., Weisbjerg, M., Eriksson, T., Tøgersen, R., Uden, P., Olafsson, B. L., Harstad, O. M. & Volden, H. (2011). Feed analyses and digestion methods. I: *NorFor - The Nordic feed evaluation system*, s. 41-54: Wageningen Academic.



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway