



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 30 stp

Fakultet for biovitenskap
Veileder Egil Prestløkken

Effekt av prosessering på nedbrytning av tørrstoff og stivelse målt med ANKOM Daisy^{II} inkubator

The effect of processing on degradation
of dry matter and starch, measured with
ANKOM Daisy^{II} incubator

Katrine Østraat

Husdyrvitenskap
Fakultet for Biovitenskap

Forord

Med denne masteroppgaven avslutter jeg et femårig studium innen husdyrvitenskap, ved fakultet for biovitenskap, ved Norges miljø- og biovitenskaplige universitet. Det har vært fem lærerike år som gir meg et godt grunnlag å bygge ny kunnskap på i arbeidslivet.

I denne oppgave har jeg valgt å skrive om fordøyeligheten av pellet med ulik fysisk struktur, fordi jeg fikk tilbud om å bidra litt til Gulam Qasim Khans doktorgradsavhandling.

Utgangspunktet var å se på fordøyeligheten til pelletene med en ANKOM Daisy inkubator, men fordi resultatet mellom rundene varierte en del, ble det også undersøkt om ANKOM Daisy inkubator gir stabile resultater. Underveis har jeg lært at det er vanskelig å få de resultatene jeg ønsker, når man gjennomfører et forsøk.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder Egil Prestløyken som har hjulpet meg mye med denne oppgaven. Jeg vil også takke mine medstudenter som i disse dager også har jobbet hardt på datasalen for å bli ferdig med sine masteroppgaver. De har gitt moralsk støtte, samt at vi har lest korrektur på hverandres oppgaver.

Fakultet for biovitenskap, NMBU

Ås, 15.05.2018

.....
Katrine Østraat

Sammendrag

Denne oppgaven består av litteraturredel og egne undersøkelser. Litteraturredelen gir en kort oversikt over drøvtyggerens fordøyelsessystem, hvordan den fordøyer fôr og hvordan fordøyelsesforsøk kan bli gjennomført. Fôrrasjonen til en høytytende drøvtygger består av både grovfôr og kraftfôr. Kraftfôr er et næringsrikt fôr og inneholder som oftest mye stivelse, som lett blir fordøyd i vom. Ulempen er at når større mengder kraftfôr blir gitt på en gang, vil fermenteringen reduserer pH i vom. Det gir mindre gunstige levekår for cellulolytiske bakterier som fermenterer fiber. Derfor er det et ønske å produsere kraftfôr som har redusert nedbrytningshastighet i vom, men like god total fordøyelighet som tidligere.

Egne undersøkelser er et in vitro forsøk som testet om den fysiske strukturen til pellet påvirket nedbrytningshastigheten med ANKOM Daisy^{II} inkubator. Det ble testet tre typer kraftfôr som besto av 100% bygg, men med ulik fysisk struktur. De tre fôrene ble produsert med en ekstruder, der innstillingene bestemte diameteren, lengden, tettheten, hardheten og vannstabiliteten til pelletene i de ulike fôrene. Det ble også sett på om ANKOM Daisy^{II} gir stabile resultater. Det ble gjennomført 8 runder med forsøk, der de tre siste rundene ble undersøkt tørket og malt grovfôr i tillegg til forsøksfôret. Prøvene ble inkubert i henholdsvis 12, 24, 48 og 96 timer.

Den fysiske strukturen påvirker nedbrytningen av pelletene. Pelletene som har høyest tetthet, er hardest og mest vannstabile, er de som har lavest nedbrytning. Det er samtidig vanskelig å avgjøre hva nedbrytningen faktisk er fordi det var signifikant forskjell i fordøyelighet mellom rundene. Samtidig var det omtrent samme variasjon mellom forsøksfôrene innad i rundene. Den store variasjonen mellom rundene indikerer at metoden til ANKOM Daisy^{II} inkubatoren er lite egnet til å fordøye hele pellet.

Abstract

This master thesis have a literature part and my own research. The literature part gives a short summary of the ruminant's digestive tract, how they digest the feed and how digestibility can be tested. The food rations to a high performing ruminant consists of both roughage and concentrates. Concentrates is highly nutritious and usually contains plenty of starch, which are easily digested in the rumen. The downside is that when a large amount of concentrates is given at the same time, the fermentation will reduce the pH in the rumen. That gives less optimal living conditions for cellulolytic bacteria that ferments fiber. This creates a desire to produce concentrates that has a reduced decomposition time in the rumen, yet just as good total digestibility as before.

In this in vitro experiment it was tested if the physical structure to the pellets affected the speed of decomposition with an ANKOM Daisy incubator. Three different concentrates made with barley was tested, each with different physical structure. They were produced with an extruder, where the production settings decided the physical factors of diameter, length, density, toughness and water stability. In addition, there was experiments done considering the ability of the ANKOM Daisy incubator to produce stable results. 8 rounds of experiments was done, with the last three had included dried and grounded roughage in addition to the test feed. The tests were incubated in 12, 24, 48, and 96 hours, respectively.

The physical structure affects the speed of composition. The pellets with highest density, and is hardest and most water stable are those with lowest speed of decomposition. It is however hard to pinpoint what the speed of decomposition is, because of significant differences in digestibility between rounds. At the same time, there was approximately the same variation between the tree test feeds within the rounds. This big variation between rounds indicate that the ANKOM Diasy incubator is unsuited to digest whole pellets.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Innholdsfortegnelse	IV
1 Innledning.....	1
Hypoteser	2
2 Litteratur.....	3
2.1 Oppbygging av drøvtyggerens fordøyelseskanal	3
2.1.1 Munn og formagene	3
2.1.2 Løypen og tarmsystemet	5
2.2 Hovednæringsstoff.....	6
2.2.1 Karbohydrater.....	6
2.2.2 Proteiner	7
2.2.3 Fett.....	8
2.3 Fordøyelse av hovednæringsstoff.....	10
2.3.1 Karbohydrater.....	10
2.3.2 Proteiner	10
2.3.3 Fett.....	11
2.4 Samspillet i fordøyelsen	12
2.5 Fastsetting av fordøyelighet (in vivo, in situ/sacco, in vitro)	14
2.5.1 In vivo	14
2.5.2 In sacco.....	15
2.5.3 In vitro	16
3 Material og metode.....	19
3.1 Om pelletene.....	19
3.2 Fremgangsmåte in vitro DAISY	21
3.3 Beregninger	25
4 Resultater.....	27
4.1 Metodevurdering av ANKOM Daisy ^{II}	27
4.2 Egenskaper ved pelletene	29
4.3 Nedbrytningshastighet i pelleten	33
5 Diskusjon.....	34
6 Konklusjon	36
Kilder:.....	37

1 Innledning

Drøvtyggere tilhører underordenen Ruminantia. Våre vanlige husdyr (ku, sau og geit) tilhører familien Bovidae, som alle er planteetere. Fordøyelseskanalen til Ruminantia er kjennetegnet ved formager. Disse heter vom, nettmage og bladmage på norsk, og kan fysiologisk betraktes som tre utposninger på spiserøret. Etter formagene kommer kjertelmagen som heter løype på norsk. I formagene er det mikrobiell fordøyelse som gjør det mulig å utnytte tungtfordøyelige karbohydrater som cellulose og hemicellulose i fôr (Hvelplund & Nørgard 2003).

Rasjoner til drøvtyggere inneholder ikke bare tungtfordøyelige karbohydrat, men også en god del lettere fordøyelig næringsstoff som protein og stivelse i kraftfôr. Felles for alle næringsstoff er imidlertid at de kan forsvinne fra formagene enten gjennom passasje eller nedbrytning. For et næringsstoff vil fordøyelighet i vom bli bestemt gjennom hvor raskt fôret blir brutt ned og hvor raskt det kan passere ut.

Ulikt fôr brytes ned og passerer ut fra vom/nettmage med ulik hastighet. Lett fordøyelig og findelt fôr, passerer raskt ut fra vom. Grove fôrpartikler tar lang tid å bryte ned og har lang oppholdstid i vom. For at det grove fôret skal forlate vom, må det først brytes ned til mindre deler, både mekanisk (drøvtygging) og mikrobielt. Dette gir lettfordøyelig fôr en tidsuavhengig passasje, og tungt fordøyelig fôr en tidsavhengig passasje ut fra vom (Hvelplund & Nørgard 2003)

En høyt ytende drøvtygger, er avhengig av energirikt og lett fordøyelig fôr for å kunne produsere bra. Kraftfôr basert på stivelse og proteinrike råvarer, er både energirikt og lett fordøyelig. Bakdelen er at stivelse fermenteres raskt og gir høy produksjon av flyktige fettsyrer (VFA), som senker pH i vom. Lav pH gir et dårlig vommiljø der mikroorganismene er mindre effektive med hensyn på fordøyelse av tungt fordøyelige karbohydrater og produksjon av mikrobeprotein. For best mulig utnytting av næringsstoffene i fôret er det derfor ønskelig med et kraftfôr med lavere fordøyelighet i vom, men med god total fordøyelighet. Dette kan gjøres enten gjennom å redusere nedbrytningshastigheten av kraftfôr i vom, eller ved å øke passasjehastigheten av kraftfôr fra vom uten at det går ut over fordøyeligheten av kraftfôret i tarmen. Problemstillingen for denne oppgaven er å undersøke om det mulig å påvirke fordøyeligheten av kraftfôr i vom ved å endre de fysiske egenskapene til pelletene gjennom prosesseringen av dem. Dette vil gi fôrindustrien og brukerne av fôret større mulighet til tilpasse fôringa etter behov.

Oppgaven er delt inn i en litteraturodel og egne undersøkelser. I litteraturodelen vil drøvtyggenes fordøyelsessystem og faktorer som påvirker nedbrytningshastighet i og passasjehastighet fra vom bli kort beskrevet. I egne undersøkelser vil resultat fra et gjennomført in vitro fordøyelighetsforsøk med ANKOM Daisy^{II} inkubator bli presentert. Forsøket tar for seg hvordan de fysiske egenskapene til pellets påvirker nedbrytningen av tørrstoff og stivelse. Resultatene vil bli diskutert med hensyn på hvilken betydning de fysiske egenskapene kan ha for fordøyelse av næringsstoffene. Det vil også bli diskutert om metoden til ANKOM Daisy^{II} inkubatoren fungerer til å bestemme fordøyeligheten til hele pellet.

Hypoteser

H_{0a}: Ulike fysiske egenskaper ved pellets påvirker ikke nedbrytningen.

H_{0b}: ANKOM Daisy^{II} er en god måte å finne fordøyeligheten til fôr

H_{1a}: Lavere tetthet på pelleten øker nedbrytningen.

H_{1b}: In vitro fordøyelighet med ANKOM Daisy^{II} er en lite nøyaktig måte å finne fordøyeligheten til et fôr.

2 Litteratur

2.1 Oppbygging av drøvtyggerens fordøyelseskanal

Drøvtygger er herbivore dyr som lever av plantemateriale. Mange av plantene inneholder cellulose og hemicellulose. Dette er polysakkarider der glukosemolekylene er bundet sammen med β -bindinger som dyret sine egne fordøyelsesenzymmer ikke klarer å bryte. For å kunne fordøye plantene lever drøvtyggerne i en symbiose med mikroorganismer i formagene. Formagene er uten egen produksjon av enzymer, men mikroorganismene som lever der produserer enzymene som kan bryte β -bindingene i cellulose og hemicellulose og dermed utnytte energien i plantemateriale. Dette kapittelet vil se nærmere på fordøyelseskanalen og hvordan den er bygget opp, med spesielt fokus på formagene.

2.1.1 Munn og formagene

Fordøyelseskanalen starter med munnhulen. Ved beiting river dyrene av plantene med tennene og svelger det nesten utygget. Tilsvarende vil de når de spiser høstet fôr svelge det nesten utygget. Seinere vil dyrene gulpe fôret opp igjen og tygger det grundig før det svelges på nytt. Det er dette som blir kalt drøvtygging.

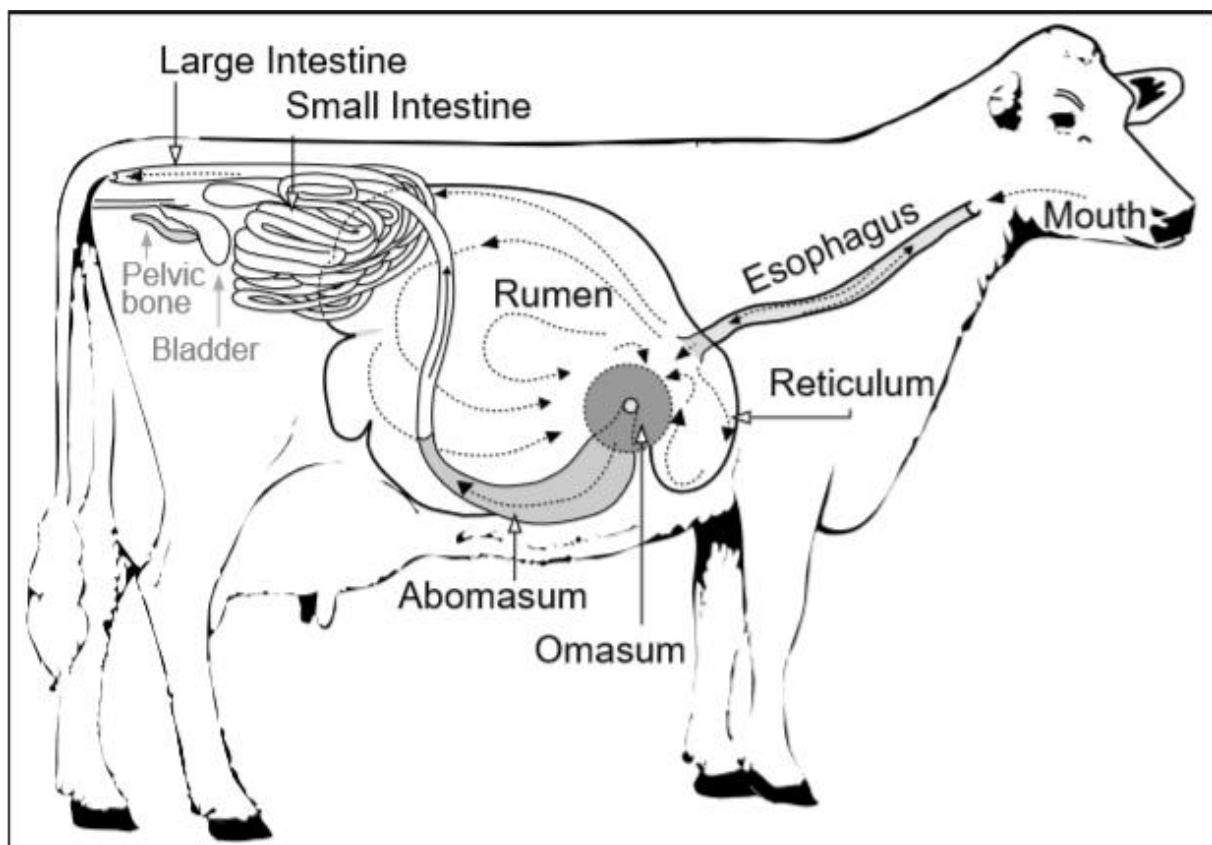
Spiserøret forbinder munnhulen med formagene og ender øverst i nettmagen som er en av tre formager (Figur 2.1) (Hvelplund & Nørgard 2003). De to andre er vomma og bladmagen. Som nevnt tidligere, kan formagene betraktes som utposninger på spiserøret og kommer før den virkelige magesekken som kalles løypen.

Vomma er den største av formagene, og består av tre blindsekker (dorsale, ventrale og craniale) som er delvis adskilt av muskelfolder. Innvendig er vomma dekket av papiller på 1-3 mm. Disse papille øker overflaten til vomveggen og sørger for absorpsjon av flyktige fettsyrer (VFA), vann og enkelte ioner. I tillegg blir urea transportert fra blod via vompapillene og inn i vom. Innholdet i vom er lagdelt. Øverst er det gass, i hovedsak CO₂ og metan, som dyret raper ut med jevne mellomrom. I midten kommer flytelaget, som består av grove fôrtikler, litt væske og mikroorganismer. Det er fra flytelaget drøvtyggere gulper opp fôr til drøvtygging. I bunn er væskelaget som består av findelte fôrtikler, væske og mikroorganismer (Hvelplund & Nørgard 2003). Vomveggen består av glatt muskulatur, som sørger for systematiske sammentrekninger i vomma. Disse sammentrekningene (kontraksjonene) sørger for omrøring av vominnholdet, samt at VFA, vann og ioner kommer i kontakt med vomveggen og kan bli

absorbert. Kontraksjonene sørger også for at findelte fôrpartikler kommer over i nettmagen og kan passere ut gjennom bladmagekanalen (Sjaastad et al. 2016).

Vom og nettmage er nært forbundet. Nettmagen ligger lengst frem i bukhulen og er skilt fra vom med en muskelfold. Fôret passerer likevel relativt fritt mellom dem og de fungerer i stor grad som en enhet. Papillene i nettmagen er formet som et nettingmønster og bidrar til å finfordele fôrpartiklene før de passerer ut av vomma da åpningen til bladmagekanalen og dermed passasjen ut av vomma er i nettmagen (Sjaastad et al. 2016).

Bladmagekanalen binder sammen vom/nettmagen med bladmagen. Bladmagekanalen åpner seg når vom/nettmage kontraherer, og findelt fôr fra væskelaget passerer gjennom til bladmagen. Innsiden av bladmagen er dekket med rader av vertikale vevsfolder på 1-3 mm tykkelse. Disse foldene er dekket med papiller for å øke overflatearealet. Vann, VFA og ioner blir absorbert fra bladmagen slik at løypen ikke behøver produsere så mye saltsyre for å redusere pH til ønsket nivå (Sjaastad et al. 2016).



Figur 2.1: Illustrasjon av kuas fordøyelsessystem (Wattiaux 1998).

2.1.2 Løypen og tarmsystemet

Løypen kommer etter bladmagen, og er kjertelmagen. I løypen blir det sekretert saltsyre og pepsiner, som i hovedsak starter proteinnedbrytningen. I motsetning til enmagede dyr fungerer ikke løypen som lager for fôr, og pH er litt høyere (3-4) (Sjaastad et al. 2016).

Fra løypen passerer fôret over til tynntarmen. På samme måte som vom, er innsiden av tynntarmen er dekket med tarmtotter for å øke overflaten og absorpsjonsevnen. I tolvfingertarmen blir det sekretert fordøyelsesenzymene via galle og bukspytt, som bryter næringsstoffene ned til monomere forbindelser (enkeltstående næringsstoffer som aminosyrer, monosakkarid, monoglyserid og frie fettsyrer) som blir absorbert via tarmveggen. (Sjaastad et al. 2016)

Etter tynntarmen kommer blindtarmen og tjukktarmen. I motsetning til tynntarmen, er innsiden av tjukktarmen og blindtarmen glatt, noe som reduserer absorpsjonsevnen. I denne delen av tarmsystemet blir ufordøyd fôr fermentert, samtidig som vann, ioner og VFA fra fermenteringen blir absorbert. Mikrobeprotein fra fermentering i tjukktarm ender i avføringen, fordi det ikke er noen mulighet til å fordøye det. Til sist når fôret endetarmen og kommer ut som avføring (Hvelplund & Nørgard 2003; Sjaastad et al. 2016).

2.2 Hovednæringsstoff

Hovednæringsstoff blir normalt delt inn i karbohydrater, proteiner og fett. Innholdet av dem varierer mellom ulike fôrslag. Korn inneholder mye karbohydrater, mens for eksempel soyabønner inneholder mye proteiner og fett, og oljefrø inneholder mye fett. Eksempler på innhold av næringsstoff i noen vanlige fôrmidler er vist i Tabell 2.1.

Tabell 2.1 Eksempel på næringsinnhold i noen vanlige fôrmidler (NorFor 2018). Verdier i g/kg tørrstoff (TS) om ikke annet er oppgitt.

Fôrslag	TS, g/kg	Råprotein	Fett	Stivelse	Sukker	NDF ¹	Aske
Ungt gress	224	168	31	0	32	507	69
Surfôr tidlig	332	167	39	0	92	436	77
Surfôr sent	316	140	35	0	35	567	64
Bygg	883	113	32	615	15	198	23
Havre	896	113	64	492	13	287	28
Hvete	881	131	28	667	14	127	19
Soyabønner	900	410	222	55	50	94	55
Raps/ryps frø	936	218	452	8	66	176	47

¹ NDF = Nøytralløselige fiber

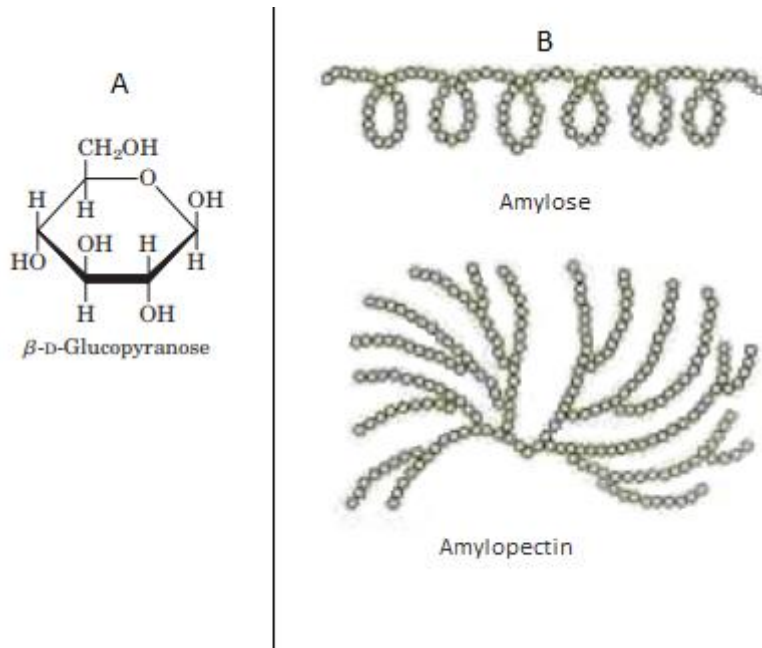
2.2.1 Karbohydrater

Karbohydratene kan deles inn i monosakkarid, oligosakkarid og polysakkarid. Eksempel på monosakkarid er glukose (Figur 2.2 A) og fruktose. Oligosakkarider består av to til ti monosakkarider, for eksempel disakkaridet laktose som består av glukose og galaktose. Polysakkarider inneholder mange monosakkarider satt sammen til komplekse molekyler. Noen vanlige polysakkarider er stivelse, cellulose og hemicellulose. Stivelse består av mange glukosemolekyler bundet sammen med α -1,4 bindinger. Cellulose består også av glukose, men glukosemolekylene er bundet sammen med β -1,4 binding (McDonald et al. 2011).

Til drøvtyggere er det vanlig å dele karbohydratene inn i sukker, stivelse og nøytralløselige fiber (NDF). Sukker og stivelse blir lett fermentert i vom. Nøytralløselige fiber er derimot tungt nedbrytbart, hovedsakelig fordi cellulose og hemicellulose er bundet til lignin og denne bindingen er vanskelig å bryte. Lignin er ikke et karbohydrat, men fordi det påvirker fordøyeligheten til karbohydrater i stor grad, blir den regnet med i denne fraksjonen (Harstad et al. 1994; Wattiaux 1998). Stivelse i form av amylose og amylopektin (Figur 2.2 B), finnes

hovedsakelig i korn og andre typer frø som for eksempel bønner, som vist i Tabell 2.1.

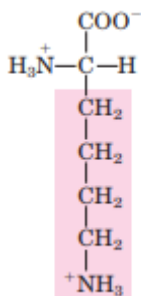
Nøytralløselige fiber opptrer i cellevegger for å stive av for eksempel strå.



Figur 2.2: Eksempel på glukose (A)(Nelson et al. 2013), og stivelse (B) (Svihus 2017).

2.2.2 Proteiner

Proteiner består av aminosyrer satt sammen på ulike måter. Et dyr har ikke behov for protein, men for aminosyrene som proteinet består av. Aminosyrer består av en aminogruppe (ufarget del) og en sidegruppe (rosa på Figur 2.3). Det er sidegruppen som avgjør egenskapene til en aminosyre.



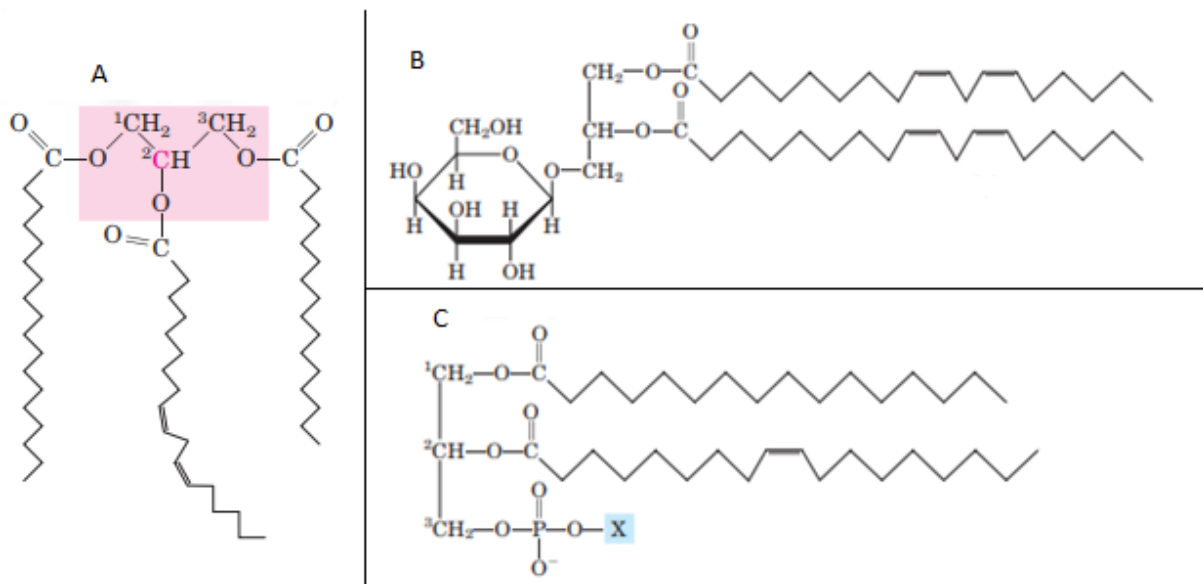
Figur 2.3: Aminosyren lysin (Nelson et al. 2013).

Den vanligste måten å analysere for protein, er med Kjeldahl metoden. Kjeldahl metoden finner innholdet av nitrogen i en prøve og ganger denne verdien med 6,25 (er i gjennomsnitt 16% nitrogen i protein). Dette blir kalt råprotein og består både av reinprotein (aminosyrer satt sammen til protein) og ikke protein nitrogen (NPN), som er andre nitrogenholdige

forbindelser som for eksempel urea og ammoniakk. Råprotein kan gi et inntrykk av proteinverdien i et drøvtyggerfôr, fordi mikrobene i vom benytter nitrogen både fra reinprotein og NPN til egen vekst og formering. Mikrobeprotein som er en viktig proteinkilde for drøvtyggere, er de mikrobene som følger fôret ut fra vom og blir fordøyd (Hvelplund & Nørgard 2003).

2.2.3 Fett

Det tredje hovednæringsstoffet er fett. Vanligvis er det 4-5 % fett i en drøvtyggerrasjon. Dette er i hovedsak triglyserider, galaktolipider og fosfolipider. Triglyserid (Figur 2.4 A) består av glyserol og tre fettsyrer. Triglyserider blir vanligvis funnet i oljefrø, dyrefett og korn, der oljefrø og korn i kraftfôr er de viktigste kildene for en drøvtygger. Galaktolipid (Figur 2.4 B) ligner triglyserid, men en av fettsyrene er byttet ut med et suktermolekyl, vanligvis galaktose. Galaktolipider blir vanligvis funnet i gress og belgplanter. Fosfolipid (Figur 2.4 C) har byttet ene fettsyren ut med fosfatmolekyl. Viktige kilder til fosfolipider er vommikrobene (Wattiaux 1998) og i soyabønner (McDonald et al. 2011).



Figur 2.4: Eksempel på et triglyserid (A), galaktolipid (B) og fosfolipid (C) (Nelson et al. 2013).

Fettsyreprofilen varierer mellom ulike fôrslag. I Tabell 2.2 er deler av denne profilen gjengitt.

Tabell 2.2: Oversikt over fettsyresammensetningen i noen vanlige førmidler (Hvelplund & Nørgard 2003).

Førmiddel	Fettsyrer % av TS	Fettsyrefordeling i vektprosent								Beregnet jodtall ¹ i fettsyrene
		<C 12	C 12:0	C 14:0	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	
Ungt gress	2,9	-	0,2	0,2	17,3	1,6	1,9	15,4	63,4	203
Gress ved skyting	1,9	-	0,1	0,4	18,8	1,7	2,6	17,0	59,4	196
Gressensilasje	1,8	-	0,8	1,2	18,8	2,6	4,6	18,8	51,1	180
Bygg	2,8	-	0	0,4	24,3	1,2	10,8	56,4	6,7	129
Palmeolje	-	0	0	1,4	40,1	5,5	42,7	10,3	0	57
Kokosolje	-	14,6	45,4	18,0	10,5	2,3	7,5	0	0	7
Soyaolje	-	0	0,2	0,1	9,8	2,4	28,9	50,7	6,5	136
Rapsolje	-	0	0	0	4,4	1,4	54,3	19,5	11,4	115

¹ = jodtall forteller om mengden dobbeltbindinger i råfett. Hver dobbeltbinding kan binde til seg et jodatom. Jodtallet er antall gram jod som binder seg til 100 gram fett (Hvelplund & Nørgard 2003).

Det er lite fett i gress og grovfôr, men av de fettsyrene som er der, dominerer den polyumetta fettsyren α -linolensyre (C 18:3). Bygg og havre har lavt fettsyreinhold med relativt høy andel av henholdsvis linolsyre (C18:2) og oljesyre (C18:1). Oljene består av nesten 100% fett, men også her er det variasjon i sammensetningen. Palmeolje inneholder mye lange fettsyrer som palmitinsyre (C 16:0) og oljesyre (C 18:1). Soyaolje og rapsolje inneholder mye oljesyre (C 18:1) og linolsyre (C 18:2). Kokosolje inneholder derimot mer av de mellomlange fettsyrene, spesielt laurinsyre (C 12:0). Kapitel 2.3.3 forteller mer om hvordan fett påvirker fermentering i vom.

Det er vanlig å bestemme fettinnholdet som råfett. Råfett blir funnet ved ekstraksjon med et upolart løsemiddel. Etter at løsemiddelet er fordampet, er råfett en rest som består av alle fraksjonene løsemidlet har klart å løse ut. For å finne fettsyreinholdet og fettsyreprofilen, må prøven bli hydrolysert og fettsyrene analysert med gass kromatografi (Seppänen-Laakso et al. 2002).

2.3 Fordøyelse av hovednæringsstoff

I vom er det over 200 ulike bakterier (McDonald et al. 2011), som grovt kan bli delt inn i kategoriene amylolytiske, cellulolytiske, lipolytiske og proteolytiske bakterier, ut fra hvilke næringsstoffer de bryter ned. I tillegg kommer protozoer og sopp som er med på å bryte ned fôret. Fordøyelsen av karbohydrater, protein og fett er omtalt i de etterfølgende kapitlene.

2.3.1 Karbohydrater

Karbohydrater er den viktigste energikilden til drøvtyggere samt utgangspunkt for syntetisering av fett og glukose til melkeproduksjon (Wattiaux 1998). Karbohydratene blir i stor grad fermentert i vom av mikroorganismer, som gjør drøvtyggerne i stand til å utnytte energien også i fiber. Restproduktet fra denne fermenteringen er mikrobeprotein som blir omtalt senere, gassene CO₂ og metan, samt flyktige fettsyrer (VFA) der de viktigste er propionsyre, eddiksyre og smørsyre. VFA blir absorbert via vomveggen og brukt til ulike metabolske prosesser. Propionsyre blir omdannet til glukose i lever, mens eddiksyre og melkesyre blant annet blir brukt for å syntetisere melkefett i juret (Hvelplund & Nørgard 2003).

De amylolytiske bakteriene er med på å bryte ned stivelse og andre lettfordøyelige karbohydrater. Denne fermenteringen skjer raskt og kan gi en høy produksjon av VFA på kort tid, som kan føre til redusert pH i vom. En annen gruppe med bakterier er de cellulolytiske bakteriene, som er med på å fermentere cellulose, hemicellulose, fruktoser og pektiner (Sjaastad et al. 2016). De cellulolytiske bakteriene tåler lav pH dårlig.

2.3.2 Proteiner

For en drøvtygger er mikrobeprotein den kvantitativt viktigste proteinkilden. Omsetningen av protein i vom er kjennetegnet ved at proteolytiske bakterier bryter proteinet ned til aminosyrer og ammoniakk. Med bakgrunn i energi (ATP) fra nedbrytningen av karbohydrater og tilgangen på aminosyrer og ammoniakk bygger disse og andre mikrober opp eget «kroppsprotein». Det er dette proteinet som blir kalt mikrobeprotein. Mikrobeprotein er dermed en samlebetegnelse på protein fra bakterier, protozoer og sopp som blir med fôr og væske ut fra vom. Mikrobene består av ca. 50% protein og når de sammen med ikke nedbrutt fôrprotein blir fordøyd i tynntarmen gir de aminosyrer absorbert i tarm (AAT).Referanse

Effektiviteten i syntesen av mikrobeprotein er avhengig av flere forhold. To av de viktigste er forholdet mellom nitrogen og energi, grovfôropptaket.

Dette er utviklet egne proteinvurderingssystemer for drøvtyggere. Et av disse systemene er AAT/PBV (aminosyrer absorbert i tarm/proteinbalanse i vom) systemet som blir brukt i Norden. AAT forteller hvor mange gram aminosyrer som absorberes i tarm per kg tørrstoff (TS). PBV er proteinbalansen i vom, beskriver balansen mellom nedbrytbart råprotein og tilgjengelig energi i vom. Er det mye råprotein i forhold til energi, vil PBV bli positiv, motsatt gir negativ PBV. Dermed er det PBV som avgjør hvor mye protein som blir syntetisert i vom og mengde AAT i tarmen.

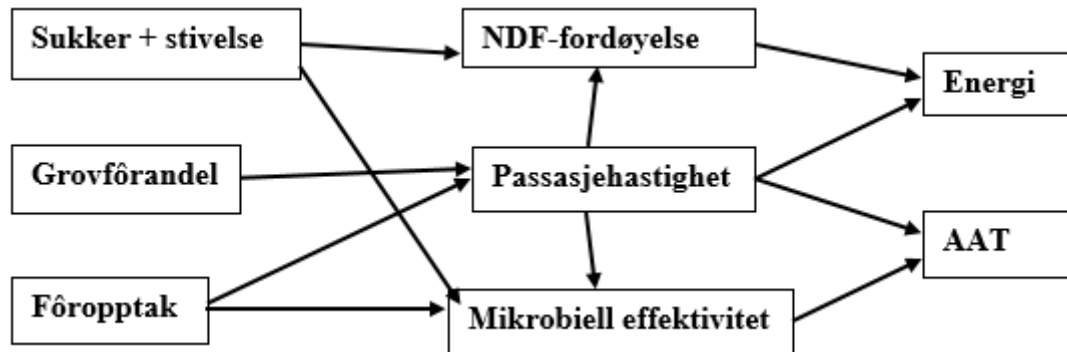
2.3.3 Fett

Fett i form av triglyserider blir, i motsetning til karbohydrater og protein, ikke fermentert i vom. I stedet blir fett hydrolysert (omdannet til glyserol og frie fettsyrer) av de lipolytiske bakteriene i vom. Glyserol blir omdannet til glukose og brukt som energikilde for mikrobene. De frie umetta fettsyrene blir hydrogenert (gjort metta) og fester seg til fôrpertikler som forlater vom (McDonald et al. 2011). Noen av fettsyrene blir også tatt opp av mikroorganismene, i tillegg syntetiserer mikrobene egne fettsyrer, som ofte kjennetegnes med mange sidekjeder. Mange av fettsyrene som blir syntetisert av mikrobene blir funnet igjen i melk, selv om de kun utgjør en liten del av melkefettet.

Ulike fettsyrer påvirker mikrobene ulikt. Mellomlange fettsyrer og polyumetta fettsyrer kan virke toksisk på mikrobene, men lange metta fettsyrer påvirker mikrobene minst (Hvelplund & Nørgard 2003).

2.4 Samspillet i fordøyelsen

Fôrverdien til et fôr er bestemt av ulike faktorer ved dyret og fôret og det er mange samspill mellom dyret og fôret. Figur 2.5 gir en forenklet versjon av noen av disse samspillene.



Figur 2.5: Forenklet figur over samspillene som påvirker fôrverdien. Tegnet selv med utgangspunkt i figur fra Harald Volden og egne forelesningsnotater.

I prinsippet er det i hovedsak to faktorer som påvirker fordøyeligheten av et fôr i vom, og dermed energi og proteinverdien. Det er nedbrytningshastighet og passasjehastighet, dvs. hvor fort fôret blir fordøyd og hvor lenge det oppholder seg i vomma. Nedbrytningshastigheten blir normalt angitt som en andel av fôret som brytes ned per time (k_D), mens passasjehastigheten normalt blir angitt som den andelen av fôret som kan passere ut fra vom per time (k_P). Med disse to faktorene kjent så kan fordøyeligheten av et fôr, eller rettere næringsstoffene av et fôr i vom, bli beregnet med Formel 2.1:

Formel 2.1

$$\frac{k_D}{k_D + k_P} * 100$$

Med utgangspunkt i Figur 2.5, vil f. eks. fôropptaket påvirke passasjehastigheten av NDF, dvs. k_P . Innholdet av sukker og stivelse vil påvirke vommiljøet og dermed nedbrytningshastigheten av NDF, dvs. k_D . Dette har direkte innvirkning på fordøyeligheten av NDF i vom, som igjen avgjør energiverdien av fôret. Formelen forutsetter at alt fôr har like stor sannsynlighet for å bli brutt ned og passere ut av vom, uavhengig av oppholdstid. For NDF i grovfôr er ikke dette helt korrekt da passasjen er tidsavhengig, men det ender ikke på prinsippet om at fordøyelighet i vom er en balanse mellom k_D og k_P . NorFôr har løst det med å beskrive fordøyelsen av NDF i en to-kompartiment modell med et tidsavhengig og et tidsuavhengig kompartiment. I modellen må NDF i grovfôr oppholde seg i det tidsavhengige kompartimentet en viss tid før det kommer i det tidsuavhengige kompartimentet hvor passasjen ut skjer (Volden 2011).

For å utnytte et fôr best mulig er kjennskap til både nedbrytningshastighet og passasjehastighet viktig. Nedbrytningshastighet er ofte en egenskap tilknyttet fôrmidlet, men den blir påvirket av faktorer som rasjonssammensetning og vommiljø (pH i vom) (Hvelplund & Nørgard 2003), og den er mulig å påvirke gjennom behandling av fôr som f.eks. reduksjon i partikkelstørrelse (maling) og varmepåvirkning.

Passasjehastighet blir blant annet påvirket av fôropptak, partikkelstørrelse sammensetningen av rasjonen,

Nedbrytningshastighet og passasjehastighet er igjen påvirket av mange andre faktorer som fôropptak, sammensetningen av rasjonen samt oppholdstid og pH i vom.

2.5 Fastsetting av fordøyelighet (in vivo, in situ/sacco, in vitro)

Energiverdien til et fôr kan angis på fire nivå. Disse er bruttoenergi, fordøyelig energi, omsettelig energi og netto energi. Bruttoenergi blir funnet ved å brenne fôret og måle hvor mye energi som blir frigitt. Fordøyelig energi er brutto energien i fôret minus brutto energien i avføringen. Omsettelig energi er fordøyd energi minus energien som går tapt ved produksjon av metan og produksjon av urin. Nettoenergi er omsettelig energi minus energien tapt som varme i forbindelse med fordøyelsen og den intermediære omsetningen av næringsstoffene. Av disse kan fordøyelig energi enkelt bestemmes ved oppsamling av avføring og bestemmelse av fordøyelighet. Omsettelig energi krever i tillegg oppsamling av urin og kvantifisering av metanproduksjon. Nettoenergi er vanskeligere da varmeproduksjonen er krevende å bestemme.

Uansett, for en drøvtygger er det en sterk sammenheng mellom energi- og proteinverdien og fordøyeligheten av et fôr. Problemet er at det ikke alltid er like enkelt å måle fordøyelighet, og det er ofte forbundet med store kostnader. Det er i hovedsak tre typer forsøk som blir brukt for å finne fordøyeligheten til fôr. Det er in vivo der forsøket blir gjort i dyret, det er in situ ved bruk av enten nylonposer i vom (in sacco) eller mobile poser i tarm, og det er in vitro der forsøket foregår utenfor dyret, ofte i et glass eller en beholder. I de etterfølgende avsnitt blir disse metodene beskrevet litt nærmere.

2.5.1 In vivo

In vivo forsøk blir gjennomført direkte på dyret. In vivo fordøyelighet angir den delen av fôret som blir fordøyd, fra det blir spist til det kommer ut som avføring. På denne måten blir den tilsynelatende fordøyeligheten funnet. Noe av proteinet i avføringer er endogent eller mikrobielt protein og har allerede vært fordøyd en gang. Endogent protein er avslitte tarmceller og enzymer. Om denne mengden blir trukket fra avføringen, blir den sanne fordøyeligheten av protein funnet.

To metoder som blir brukt for å finne fordøyeligheten og passasjehastigheten til fôr er markørmetoden og vomtømmingsmetoden. Markørmetoden baserer seg på bruk av markører med kjent konsentrasjon. Markørene kan være både interne (er i fôret, f.eks iNDF (ufordøyelige fiber)) eller eksterne (tilsatt). Noen kriterier for en markør er at den ikke er giftig, følger strømmen til det som blir markert (ikke flyter oppå eller faller til bunnen), ikke påvirker fordøyeligheten eller blir fordøyd selv. Det er ingen stoff som oppfyller alle kravene perfekt. For å finne fordøyeligheten med markørmetoden, må mengden markør i fôret (enten

internt i fôret eller tilsatt) og konsentrasjonen av markør i avføringen være kjent. Deretter blir differansen i konsentrasjonene beregnet. Vomtømmingsmetoden går ut på å beregne differansen mellom fiber i avføringen og fiberinnholdet i vom. Vomma blir tømt ved flere bestemte tidspunkt. Vomvæske og flytelag blir separert og forholdet mellom dem blir beregnet. Ved å se på fiberinnholdet i vomma ved flere tidspunkt og fiber i avføringen blir passasjehastigheten beregnet (Stensig et al. 1998).

Ved å kombinere de overnevnte metodene og in sacco er det mulig å beregne både passasjehastighet, nedbrytningshastighet og total fordøyelighet.

In vivo blir også brukt for å se om bestemte fôr påvirker produksjonsresultatene. For å se om et fôr påvirker produksjonsresultatet, må dyret bli tilvendt fôret i forkant, ofte 7-10 dager før selve forsøket blir gjennomført.

Noe av ulempen med in vivo forsøk er at de er omfattende, og kostnadskrevene. Dyrene må i tillegg ha stell også når de ikke er i forsøk. Det er spesielt vanskelig å undersøke fordøyeligheten av kraftfôr fordi det ikke kan fôres alene til drøvtygger.

2.5.2 In sacco

In sacco blir ofte benyttet for å finne fordøyeligheten til et fôr i vom. En kjent mengde av prøven blir veid inn i nylonposer og inkubert i vom. For å finne nedbrytningshastigheten blir nylonposene tatt ut av vom etter ulike inkubasjonstid, for eksempel etter 6, 12, 24 og 96 timer. For å finne den ufordøyelige delen av prøven blir nylonposene langtidsinkubert, ofte 288 timer (12 døgn).

For å finne tarmfordøyelighet, blir det brukt mobile nylonposer. En kjent mengde fôr blir veid inn og posene lukket med varmesveising. Posene blir så behandlet med saltsyre og pepsin for å etterligne fordøyelsen i løypen. Posene blir deretter puttet inn i tarmen via en tarmkanyale.

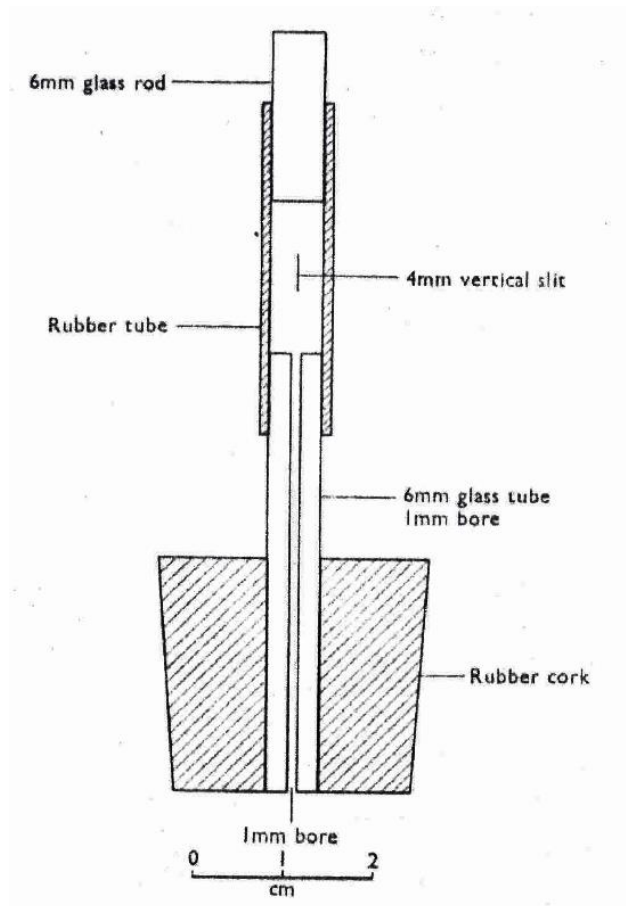
Et par av utfordringen med å bruke in sacco er muligheten for partikkeltap fra posene og forurensing av prøvene med mikrobeprotein. I tillegg kan ikke fôret bli drøvtygget eller passere ut fra vom når det er brutt nok ned. Fordelen er at det er enklere å gjennomføre enn in vivo forsøk, og det er enklere å se på fordøyeligheten til hvert enkelt fôr.

Det er òg mulig å kombinere både in vivo og in sacco forsøk for å finne fordøyeligheten til et fôr og hvordan det påvirker produksjonen.

2.5.3 In vitro

Et in vitro forsøk blir gjennomført utenfor dyret. En in vitro metode må være nøye nok til å kunne korrelere til faktiske biologiske responsene som blir undersøkt. Metoden skal også være presis både innen og mellom laboratoriene, samt spare tid og penger sammenlignet med in vivo metoder (Nocek 1988). Det finnes flere ulike forsøk for å finne fordøyeligheten til et fôr med in vitro metoder. En mye brukt metode er metoden til Tilley og Terry (1963) som er utviklet for å finne fordøyeligheten til grovfôr. En annen brukt metode er ANKOM Daisy^{II} inkubator. Disse to metodene er ved flere anledninger blitt sammenlignet (Holden 1999; Mabjeesh et al. 2000; Wilman & Adesogan 2000).

Metoden til Tilley og Terry (1963) er en to trinns metode der prøvene blir fordøyd, først i en løsning med buffer og vomsaft, deretter i saltsyre og pepsin. 0,5 grav prøvemateriale blir veid inn i sentrifugerør på 80-90 ml. Deretter blir det tilsatt 40 ml buffer og 10 ml filtrert vomsaft og blåst med CO₂ for å oppnå anaerobiske forhold. Sentrifugeglassene blir forseglet med en gummikork som slipper ut overflødig gass (Figur 2.6). De blir deretter inkubert i 48 timer på 38°C og manuelt ristet 3-4 ganger daglig. I neste steg blir det tilsatt reagens som får prøven til å sedimentere når den blir sentrifugert. Deretter blir supernatanten (klar væske over bunnfallet) fjernet. En pepsinløsning som består av pepsin, saltsyre og vann blir tilsatt resten i sentrifugerøret. Prøvene blir deretter inkubert i nye 48 timer på 38°C og ristet med jevne mellomrom. Her er det ikke viktig med anaerobiske forhold. Etter andre inkubering, blir den nye supernatanten fjernet og den uløselige resten i sentrifugeglasset blir vasket med vann i sentrifugen. Til sist blir resten i hvert sentrifugeglass overført til hvert sitt begerglass med hjelp av litt vann, og tørket til konstant vekt. Vekten til den tørre resten blir beregnet og vekten fra blindprøvene trukket fra. Det er alltid med noen blindprøver for å kunne korrigere vekten med hensyn til rester fra vomsafta.



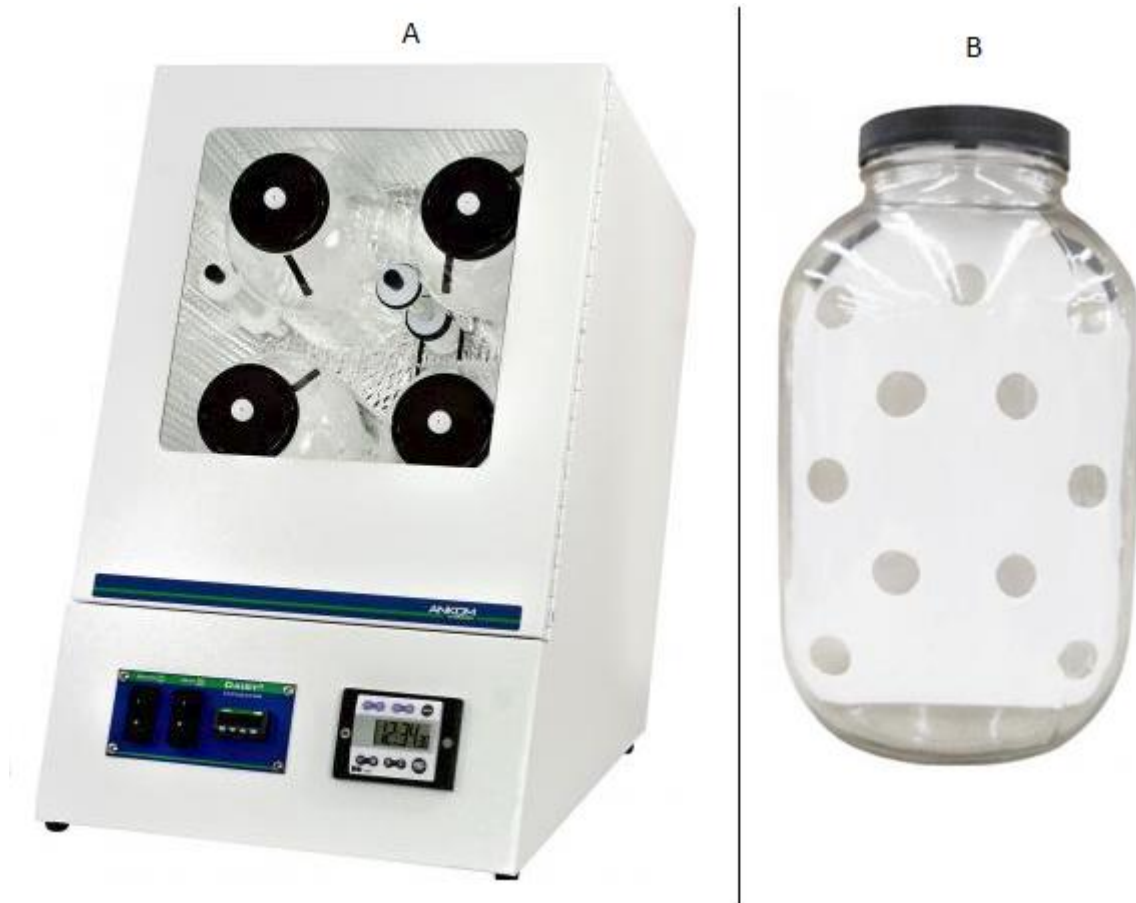
Figur 2.6: Illustrasjon av gassventil (Tilley & Terry 1963)

Tilley og Terry metoden har over tid blitt justert samt tilpasset for stivelsesanalyse. Samtidig er presisjonen til denne metoden blitt bedre. Bakdelen med denne metoden er at prøvene blir inkubert hver for seg, i tillegg er den tids- og arbeidskrevende sammenlignet med bruk av ANKOM Daisy inkubatoren (Mabjeesh et al. 2000).

In vitro metoden der fordøyeligheten blir funnet med en ANKOM Daisy^{II} inkubator (Figur 2.7 A), består i hovedsak av et trinn, der prøvene blir fordøyd i en blanding av filtrert vomsaft og buffer i 1:4 forhold. Det blir veid inn 0,25-0,5 gram prøvemateriale i filterposer, som blir forseglet med en varmesveis. Det er posens størrelse som bestemmer hvor mye prøve de bør inneholde (Adesogan 2005). Inkubasjonsglassene (Figur 2.7 B) blir fylt med 2 liter buffer og vomsaft (1,6 liter buffer og 0,4 liter vomsaft) og inntil 25 poser blir jevnt fordelt i hvert inkubasjonsglass. Det er 4 inkubasjonsglass, så inntil 100 prøver kan analyseres hver gang. CO₂ blir blåst over for å skape anaerobiske forhold. Glassene blir deretter plassert i inkubatoren i 48 timer på 39,5°C med kontinuerlig rotasjon. Etter inkuberingen blir posene skylt i springvann til skyllevannet ikke blir farget. For å finne sann fordøyelighet, skal posene plasseres i en ANKOM 200 Fiber Analyzer etter inkubering. ANKOM metoden er ved flere anledninger blitt sammenlignet med andre metoder.

Ved flere anledninger har metoden til Tilley og Terry og ANKOM Daisy^{II} blitt sammenlignet (Holden 1999; Mabjeesh et al. 2000; Wilman & Adesogan 2000). I disse forsøkene ble den samme bufferen, vomsafta og pepsinløsningen brukt i begge metodene. Dermed ble den vanlige metoden til ANKOM Daisy^{II} endret litt i forhold til beskrivelsen.

Fordelen med in vitro forsøk er at det koster mindre og går forttere en in vivo og in sacco.



Figur 2.7: ANKOM Daisy^{II} inkubator (A) og inkubasjonsglass (B).

3 Material og metode

3.1 Om pelletene

I forsøket ble det brukt 3 typer pellets produsert med ulike egenskaper med hensyn på tetthet, hardhet og vannstabilitet. De tre typene pellet ble produsert ved ekstrudering (typebetegnelsen av ekstruderen) ved Senter for fôrteknologi (FôrTek), NMBU. Ekstruderen som ble benyttet er Bühler BCTG 62 extruder (twin screw). De viktigste prosessbetingelsene er gitt i Tabell 3.1 og 3.2.

Tabell 3.1: Oversikt over produksjonsforholdene før ekstruderen

Fôr	Maling i mm	Miksing	Kondisjonering		
			Matings hastighet (Kg/t)	Kondisjonerings temperatur (°C)	Massens fuktighet etter kondisjonering (%)
1	6	120 sek	100	84	28,1
2	6	120 sek	100	93	28,3
3	6	120 sek	100	94	28,1

Tabell 3.2: Oversikt over produksjonsforholdene i ekstruderen.

Fôr	Ekstrudering			
	RPM ¹	Nedkjøling i seksjon 5	Seksjon 5 temperatur	Størrelse på form
1	Lav	Nei	111,9	6 mm
2	Lav	Ja	86,2	6 mm
3	Høy	Nei	120,3	6 mm

¹=Skruerhastighet (Runder per minutt)

Alle tre fôrene besto av 100 % bygg, malt i hammermølle på 6 mm sikt/sold. Selv om fôret besto av 100 % bygg, ble melet blandet før kondisjonering for at det skulle være standardiserte forhold. Hvordan fôrmassen ble behandlet i ekstruderen avgjorde de fysiske egenskapene til pelleten. De viktigste forskjellene framgår av Tabell 3.2 og er relatert til skruerhastighet (RPM) og kjøling i Seksjon 5 av ekstruderen. Dette ga ulik temperatur i massen, som er den viktigste prosessparameteren. Under produksjon av disse forsøksfôrene kom massen støtvis ut av ekstruderen (Khan 2018).

I de ferdig produserte pelletene ble diameter, lengde, tettheten, hardheten og vannstabiliteten målt.

Diameter og lengde ble målt med en «Digital Vernier Gauge» på 30 tilfeldige pellet av hvert fôr. Diameteren ble målt på 3 steder per pellet. Gjennomsnittlig resultat er oppgitt i Tabell 4.3.

Bulk tetthet ble målt som gram/liter. En sylindrisk kopp på 1 liter ble fylt og toppen ble forsiktig strøket vekk. Deretter ble koppen veid. Dette ble gjentatt 3 ganger og gjennomsnittet er oppgitt i Tabell 4.4.

Hardhet ble målt med en «Texture Analyzer, HK5T» (Tinius Olsen Ltd., UK). Det ble målt 30 pellet per fôr, og diameteren på pelletene var så nær gjennomsnittet som mulig. Hardheten ble målt når pelleten knakk første gang og er oppgitt i newton (N). Gjennomsnittlig resultat er oppgitt i Tabell 4.4.

Metoden for å måle vannstabiliteten er tilpasset for å etterligne forholdene i vom. ANKOM Daisy^{II} inkubatoren ble benyttet i dette forsøket. Pelletene ble lagt i ballformet te-sil (Figur 3.2) og inkubert i vomsaft på 39°C i to timer. Deretter ble de tørket på 104°C og veid for å bestemme hvor mye som er løst i vann. Gjennomsnittlig resultat er oppgitt i Tabell 4.4.

Alle disse målingene ble gjort ved FôrTek som en del av en doktorgradsavhandling og mer nøyaktig framgangsmåte for å finne disse parameterne er ikke gjengitt i denne oppgaven.



Figur 3.1: Bilde av Fôr 1, Fôr 2 og Fôr 3 (Khan 2018).



Figur 3.2: Ballformet Te-sil for måling av vannstabilitet.

3.2 Fremgangsmåte in vitro DAISY

Forsøksfôrene ble fordøyd i en ANKOM Daisy^{II} inkubator, i en blanding av buffer og vomsaft. Deretter ble de tørket, veid, malt og analysert for blant annet stivelse.

Fremgangsmåten varierte litt mellom rundene, og det blir forklart underveis.

Bufferløsningen som ble brukt til inkubasjonen besto av to løsninger (buffer A og buffer B).

Tabell 3.3 og 3.4 gir en oversikt over reagensene de inneholder og hvor mye som ble brukt per liter ferdig bufferløsning.

Tabell 3.3: Reagenser i buffer A.

Reagenser	g/liter	g/ 5,5 liter
KH_2PO_4	10,0	55,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	2,75
NaCl	0,5	2,75
CaCl_2	0,1	0,55
Urea	0,5	2,75

Tabell 3.4: Reagenser i buffer B.

Reagenser	g/liter	g/ 1,1 liter
Na_2CO_3	15,0	16,5
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,55	0,6

Bufferne ble klargjort hver for seg dagen før de skulle bli brukt. Ved tillaging av bufferne, ble det først veid opp riktig mengde av hver reagens og overført til E-kolber. Deretter ble E-kolben fylt med ca. 3 cm RO-vann og satt på en magnetrører. Når all reagens var løst i vannet, ble det fylt på med RO-vann opp til målemerket og overført til en målekolbe. Deretter ble den resterende mengden vann målt opp. Når bufferne var ferdiglaget, ble de satt i varmeskap på 39°C over natten. Bufferne ble oppbevart i hver sin målekolbe fram til bruk.

I de 6 første rundene ble buffer B helt direkte oppi buffer A rett før bruk. pH i kombinert buffer ble målt til 6,95 ved starten av runde 6. pH i den kombinerte bufferen ble ikke målt de 5 første rundene. I runde 7 og 8 ble det først målt opp 1330 ml med buffer A som ble helt over i inkubasjonsglassene, deretter ble det tilsatt ca. 266 ml av buffer B. Mengden av buffer B ble justert etter pH i den ferdige bufferen, til pH var 6.8.

I runde 7 og 8 ble prøveposene (ANKOM F57) vasket i 3-5 minutter i aceton og lufttørket i avtrekksskap. Dette var for å fjerne produksjonsrester som kunne hemme fordøyeligheten. De 6 første rundene ble ikke vasket fordi aceton ikke var tilgjengelig. Når posene var tørre ble de nummerert med vannfast tusj og veid på en vekt med 4 desimaler. Deretter ble det veid inn en pellet på ca. 250 mg i hver pose. I runde 6-8 ble det også veid inn tørket og malt grovfôr. Disse var to standardfôr alt malt på 1 mm sold, og et surfôr fra faget HFE302 som ble malt på 1 mm sold. Etter innveing ble åpningen forseglet med en varmesveis. Tabell 3.5 og 3.6 gir en oversikt over posene. Posene ble så sortert for å kunne overføre dem til inkubasjonsglass raskt. Posene ble fordelt jevnt på hver side i inkubasjonsglasset. To av posene i hvert glass var tomme, og ble brukt som blindprøver for å korrigere vekten til de andre posene etter inkubasjon og tørking. I runde 1-6 ble posene overført når buffer og vomsaft var blandet i inkubasjonsglassene og plassert i inkubatoren på 39,5°C. I runde 7-8 ble posene puttet i glassene med bare buffer og plassert i inkubatoren. Vomsaft ble tilsatt ca. 40 min senere.

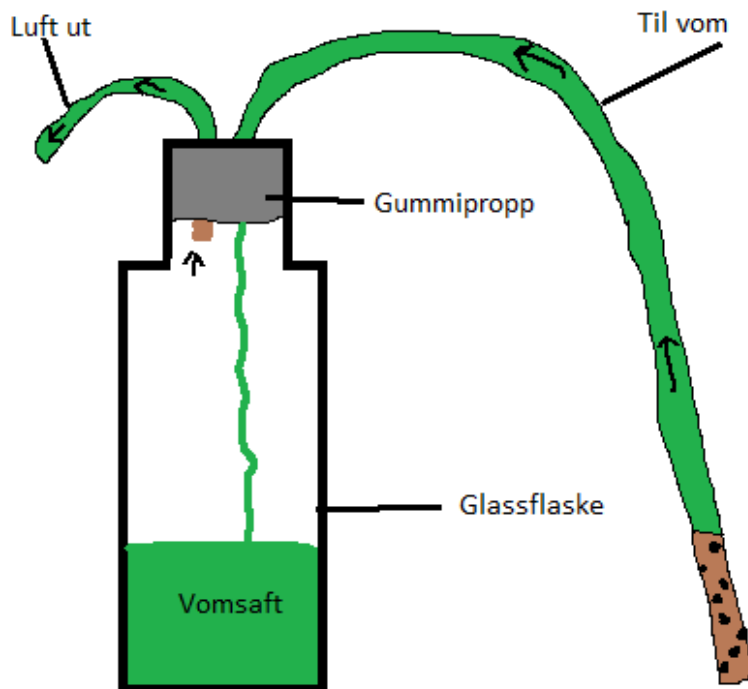
Tabell 3.5: Oversikt over fordeling av poser per tid og per fôr runde 1-5.

	T12	T24	T48	T96	Sum
Fôr 1	6	6	6	6	24
Fôr 2	6	6	6	6	24
Fôr 3	6	6	6	6	24
Blind	2	2	2	2	8
Sum	20	20	20	20	80

Tabell 3.6: Oversikt over fordeling av poser per glass og per fôr runde 6-8. Fôr 4-6 er tørket og malt grovfôr.

	T12	T24	T48	T96	Sum
Fôr 1	3	3	3	3	12
Fôr 2	3	3	3	3	12
Fôr 3	3	3	3	3	12
Fôr 4	4	4	4	4	16
Fôr 5	4	4	4	4	16
Fôr 6	4	4	4	4	16
Blind	2	2	2	2	8
Sum	23	23	23	23	92

Alt utstyret som ble brukt til uttak av vomsaft ble forvarmet til 39°C, enten med vann eller i varmeskap. Utstyret som ble benyttet til uttakene var en glassflaske (Figur 3.3) med to gummislanger festet i en gummipropp og to termosier. Ved uttak av vomsaft ble den lange slangen puttet ned i vominnholdet. Luften ble sugd ut av flasken via den korte slangen og dannet dermed et vakuum som sugde vomsaft inn i flasken. Omtrent 2 liter vomsaft ble hentet ut og overført til de forvarma termosene til hver runde, i tillegg til to håndfuller med fôrmateriale fra litt inne i flytelaget. Det ble hentet vomsaft fra to kuer på standardfôr til hver runde, men tidspunkt for uttak varierte mellom kl. 09.00 og 11.00. Kjemisk innhold av fôret er ikke kjent, men rasjonen bestod av 4 kg høy og 2 kg kraftfôr delt på to like rasjoner ca. kl 0730 og kl 2030. Ved runde 7 og 8 var kuene i tillegg i forsøk med in sacco poser.



Figur 3.3: Glassflaske med gummislanger for uttak av vomsaft (egen tegning).

Etter uttak ble vomsafta og materialet fra flytelaget overført til en foodprosessor for å løsne mikrobene fra partiklene og gi en riktig mikrobiell sammensetning i vomsafta. Runde 1-5 ble kjørt i ca. 2 min med hastighet 6 (trinnene på foodprosessen er fra 1-14, den nøyaktige hastigheten er ukjent), for at vomsafta ikke skulle sprute ut. Runde 6-8 ble kjørt på hastighet 12 i ca. 30 sekunder med mindre vomsaft og partikler oppi foodprosessen. Etter en runde i foodprosessen ble vomsafta filtrert gjennom to lag vevd tøy med åpninger på 200µm over i en E-kolbe. I runde 1-5 ble det brukt så mye tid med foodprosessen av E-kolben med vomsaft ble satt i varmeskap på 39°C mellom de to filtreringene. Arbeidet i runde 6-8 gikk

såpass mye fortære at det ikke var tid til å sette vomsafta i varmeskap. CO₂ ble blåst over vomsafta hele tiden ved alle stegene i prosedyren. Etter at vomsafta var filtrert, ble 400 ml overført til hvert inkubasjonsglass og blandet med 1600 ml buffer og inkubert i enten 12, 24, 48 eller 96 timer.

Ved endt inkubasjonstid ble posene skylt i springvann på ca. 20°C til vannet var klart. Måten posene ble skylt på varierte mellom rundene. Runde 1-3 ble posene skylt enkeltvis. Runde 4-8 ble posene helt over i et nett og dyppet 15-20 ganger i en bøtte med vann. Etter skylling ble posene lagt enkeltvis i tørkeskap på 45°C. I runde 6 og 7 ble posene tørket i et inkubatorskap på 45°C fordi alle tørkeskap var opptatt. I tillegg til de inkuberte prøvene, ble to gram av forsøksfôret og et gram av grovfôret tørket i runde 1 og 4-8 for å bestemme tørrstoffprosenten (TS%).

Prøvene ble tørket i 48 timer. Etterpå ble de veid direkte fra tørkeskapet og etter 24 timer utenfor tørkeskapet. Veiingen direkte fra tørkeskap ble gjort for å finne korrekt fordøyd tørrstoff (TS). Vekten etter 24 timer utenfor tørkeskapet ble benyttet for beregning av fordøyd stivelse.

Etter at posene var tørket og veid ble restene fra samme tid, runde og fôr slått sammen i telleglass. Posene ble først knadd for å løsne innholdet, deretter åpnet og innholdet overført til de nummererte telleglassene. Deretter ble restene malt med en kulemølle, og analysert for stivelse. I runde 6-8 var det for lite prøvemateriale igjen etter 48 og 96 timer inkubering til å bestemme innholdet av stivelse. Det er regnet statistikk på fordøyeligheten til stivelse og tørrstoff, fremgangsmåten er beskrevet i neste underkapittel.

3.3 Beregninger

Alle posene ble veid tomme (tara) og med en pellet i (brutto inn). Deretter ble posens egenvekt trukket fra bruttovekten for å finne netto vekt (netto inn) av pelleten.

Etter tørking ble posene veid direkte fra tørkeskapet (brutto ut) og minimum 24 timer etter uttak fra tørkeskapet (brutto ut ekvilibrert (ekv.)). Det var to tomme poser per glass, og gjennomsnittlig vekt av alle tomme poser per runde (8 poser) ble brukt til å korrigere netto vekten. Se Formel 3.1:

Formel 3.1

$$\text{Netto ut} = \text{brutto ut} - (\text{tara} + \text{vektøkning tomme poser})$$

$$\text{Netto ut ekv.} = \text{brutto ut ekv.} - (\text{tara} + \text{vektøkning tomme poser ekv.})$$

Den ufordøyde resten (Rest %) ble beregnet som prosent av opprinnelig prøven på tørrstoffbasis (Formel 3.2).

Formel 3.2

$$\text{Rest\%} = \text{netto ut} / (\text{netto inn} * \text{TS\%})$$

$$\text{Rest\% ekv.} = \text{netto ut ekv.} / (\text{netto inn} * \text{TS\% ekv.})$$

Gjennomsnittlig Rest% ble beregnet, og ble brukt for å lage grafer over fordøyeligheten. Alle posene med Rest% ble brukt til å regne statistikk.

Stivelse i prøvene ble analysert med et spektrofotometer. For å beregne stivelsesresten av den opprinnelige prøven, ble denne Formel 3.3 brukt

Formel 3.3

$$(\text{netto ut} * (\% \text{ stivelse i fordøyd rest} / 100)) / (\text{netto inn} * (\% \text{ stivelse i pellet} / 100)) * 100$$

- Netto ut og netto inn er gjennomsnittlig vekt per runde, fôr og tid.

Til beregning av statistikk ble programmet SAS 9.4 (SAS for Windows. Copyright (c) 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) benyttet. Prøvene ble sortert etter runde (1-8), fôr (1-3 pellet og 4-6 grovfôr), pose (gjennomsnitt av pose 1-6 avhengig av antall paralleller per fôr per runde) og tid (T12, T24, T48 og T96).

- Til statistikkberegning av sikkerheten til ANKOM Daisy^{II} inkubator ble fôr 4-6 (grovfôr), T12-T96, runde 6-8 og gjennomsnitt av pose 1-4
- Til statistikkberegning av tørrstoff ble fôr 1-3 (pellet), T12-T96, runde 1-8 og gjennomsnittet av pose brukt.
- Til statistikkberegning av stivelse ble fôr 1-3 (pellet), T12-T96 i runde 2-5 brukt og T12-T24 i runde 6-8 brukt. I runde 6-8 var det for lite prøvemateriale til å analysere for stivelse i T48-T96.

Den statistiske vurderingen ble gjort med GLM prosedyren (Proc GLM) i SAS, og forskjeller mellom effektene ble beregnet på LSmeans. For alle gruppene ble følgende modell satt opp;

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + R_j + e_{ijk},$$

Hvor:

Y_{ijk} er undersøkt variabel

μ er forventet gjennomsnitt

F_i er fast effekt av fôr, $i=1-3$

R_j er fast effekt av runde, $j=1-8$

e_{ijk} er tilfeldig feil

Statistisk sikker forskjell ble vurdert ved $p < 0,05$, mens $p < 0,1$ ble vurdert som en tendens.

Beregning av standardavviket for hardhet i N, tetthet i gram/liter og vannstabilitet er gjort i forbindelse med doktorgradsarbeidet og ikke nærmere beskrevet her.

4 Resultater

4.1 Metodevurdering av ANKOM Daisy^{II}

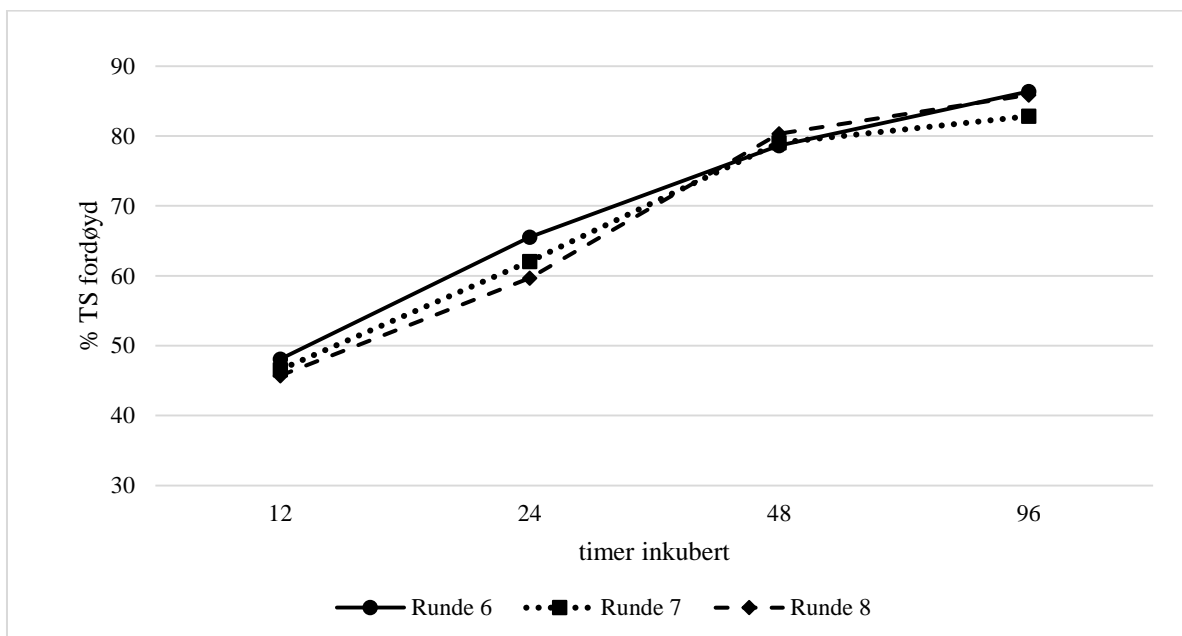
Resultatene for nedbrytningen av tørrstoff i de tre typene av grovfôr som var med de tre siste rundene for å si noe om sikkerheten til ANKOM Daisy^{II} som metode for måling av in vitro fordøyelighet er gjengitt i Tabell 4.1.

Tabell 4.1: Gjennomsnittlig fordøyd tørrstoff av grovfôr i runde 6, 7 og 8 (%) for inkubasjonstid 12 til 96 timer (T12 til T96).

	Runde 6	Runde 7	Runde 8	Std. av	Effekt av	
					Fôr	Runde
T12	48,1	46,6	45,7	2,89	0,030	0,627
T24	65,5 ^a	62,0 ^b	59,7 ^c	0,95	0,001	0,004
T48	78,6	79,1	80,3	1,68	0,009	0,503
T96	86,4 ^a	82,8 ^b	85,9 ^a	0,80	0,001	0,011

^{a-c}= angir signifikant forskjell mellom runder

Tabell 4.3 viser at det er signifikant forskjell mellom runde 6, 7 og 8 ved 24 timer og mellom runde 6 og 7 ved 96 timer inkubasjon. Det er ikke signifikant forskjell mellom runde 6 og 8 ved 96 timer. Dette er også illustrert i Figur 4.1.



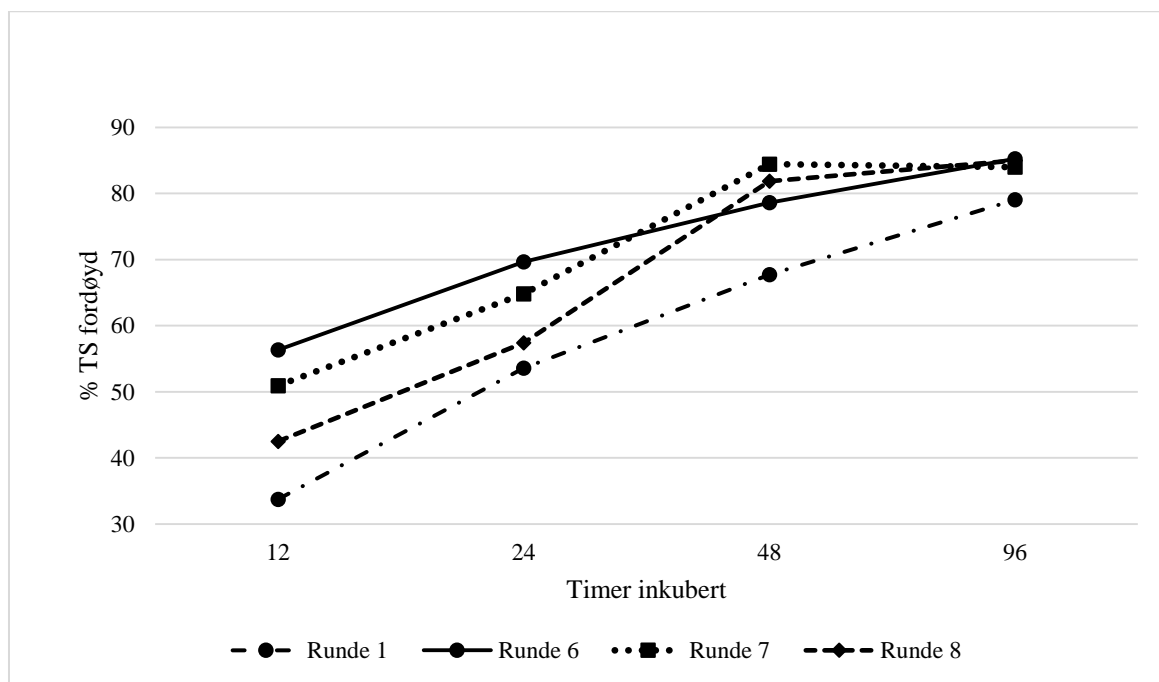
Figur 4.1: Fordøyelighet av tørrstoff (TS) i grovfôrene per runde.

Tabell 4.2: Gjennomsnittlig TS fordøyd i pellets alle runder. Signifikansnivå <0,05.

	Runde								Std. av	Effekt av Runde P
	1	2	3	4	5	6	7	8		
T 12	33,7 ^a	40,7 ^b	43,6 ^{bc}	35,5 ^a	46,6 ^c	56,3 ^e	50,9 ^f	42,5 ^b	2,4	<0,001
T 24	53,6 ^a	56,9 ^b	59,3 ^b	51,4 ^a	60,3 ^b	69,7 ^c	64,8 ^d	57,4 ^b	2,3	<0,001
T 48	67,7 ^a	73,2 ^b	81,2 ^c	73,9 ^b	79,4 ^d	78,6 ^d	84,4 ^e	81,8 ^c	1,2	<0,001
T 96	79,0 ^a	80,1 ^a	85,6 ^b	80,6 ^a	81,2 ^a	85,3 ^b	84,0 ^b	85,7 ^b	1,4	<0,001

^{a-f}=Angir signifikant forskjell mellom runder

Av Tabell 4.2 kommer det fram at det er mye variasjon mellom rundene når pellet blir fordøyd med ANKOM Daisy^{II} metoden. Figur 4.2 illustrerer dette. Runde 6, 7 og 8 er med i Figur 4.2 fordi grovfôret var med i de samme rundene, i tillegg til runde 1 som ga totalt sett den laveste fordøyeligheten.



Figur 4.2: Eksempel på variasjon mellom runder i fordøyeligheten til pelletene. I tillegg til runde 6-8 er runde 1 tatt med for å illustrere variasjonen. Det er ikke regnet statistikk på disse tallene.

Det er større variasjon i fordøyelighet av pellet mellom runder, enn det er for grovfôr. For begge kategoriene fôr er det runde 6 som har høyest og runde 8 som har lavest fordøyelighet.

4.2 Egenskaper ved pelletene

I forsøket ble det brukt tre typer pellet med ulike fysiske egenskaper. De viktigste produksjonsparameterne er vist i Tabell 3.1 og 3.2. Diameter og lengde for de produserte pelletene er vist i Tabell 4.3

Tabell 4.3: Diameter og lengde for de ulike pelletene i mm.

	Fôr 1		Fôr 2		Fôr 3	
	Diameter	Lengde	Diameter	Lengde	Diameter	Lengde
Gjennomsnitt	7,59	8,36	6,85	7,73	9,01	12,80
Std. av.	0,21	0,61	0,21	0,56	0,31	1,69

Pelletene har ulik diameter og lengde. Fôr 2 har både den minste diameteren, og er kortest (Tabell 4.3). Deretter kommer fôr 1 med middels dimensjoner, og fôr 3 med de største dimensjonene.

Ved å sammenligne resultatene i Tabell 4.3 og 4.4, ser det ut til å være en sammenheng mellom dimensjonene til pelleten og hardhet, vannløselighet og tetthet. Fôr 2 har både de minste pelletene og er hardest, mest vannstabil og har høyest tetthet.

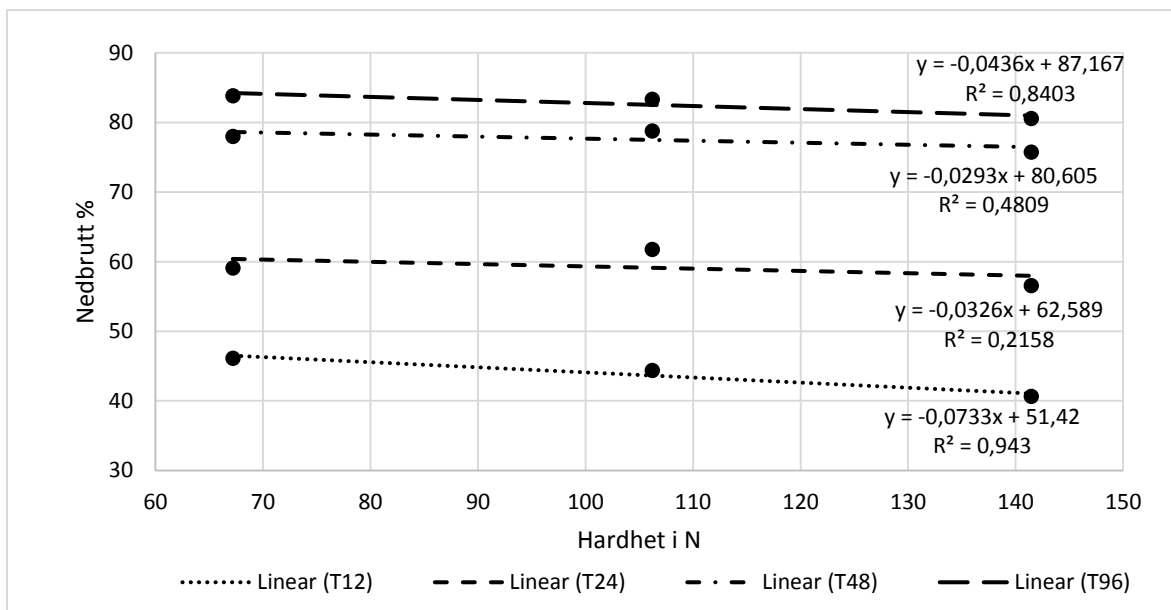
Tabell 4.4: Viser, gjennomsnittlig hardhet, gjennomsnittlig vannløselighet og gjennomsnittlig tetthet for de tre forslagene.

	Gjennomsnittlig hardhet		Gjennomsnittlig vannstabilitet ¹		Gjennomsnittlig bulk tetthet	
	Kraft (N) ²	Std. av.	%	Std. av.	g/L	Std. av.
Fôr 1	67,2	14,5	87,6	1,94	496,7	10,3
Fôr 2	141,4	20,0	91,3	1,88	601,7	13,1
Fôr 3	106,2	23,2	87,8	0,87	384,3	8,2

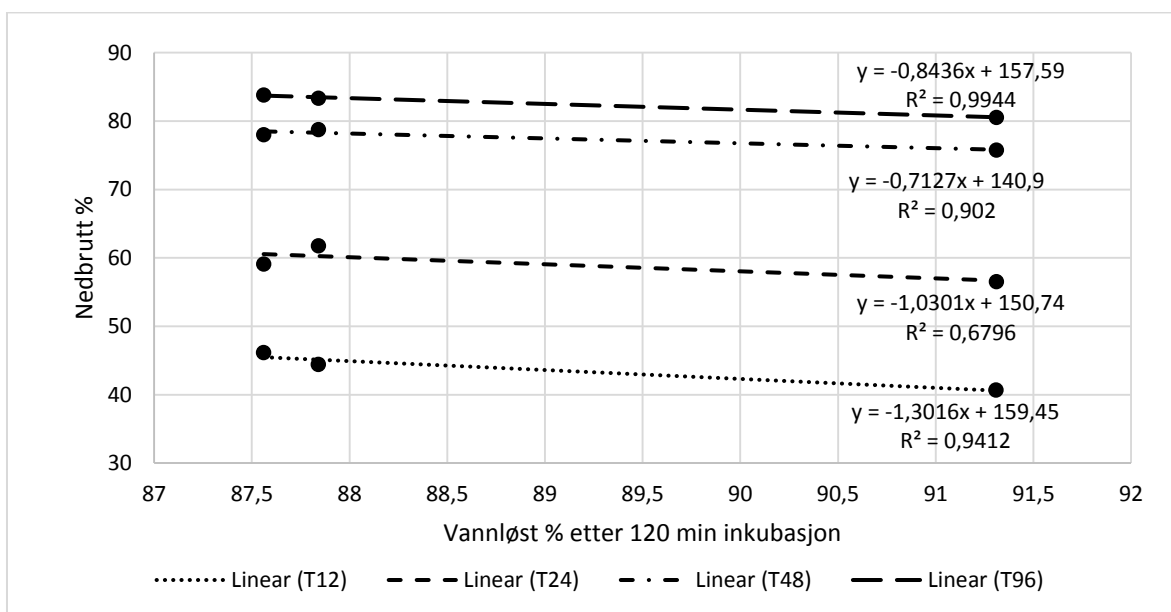
¹Inkubasjonstid i veske er 120 min

²N=newton

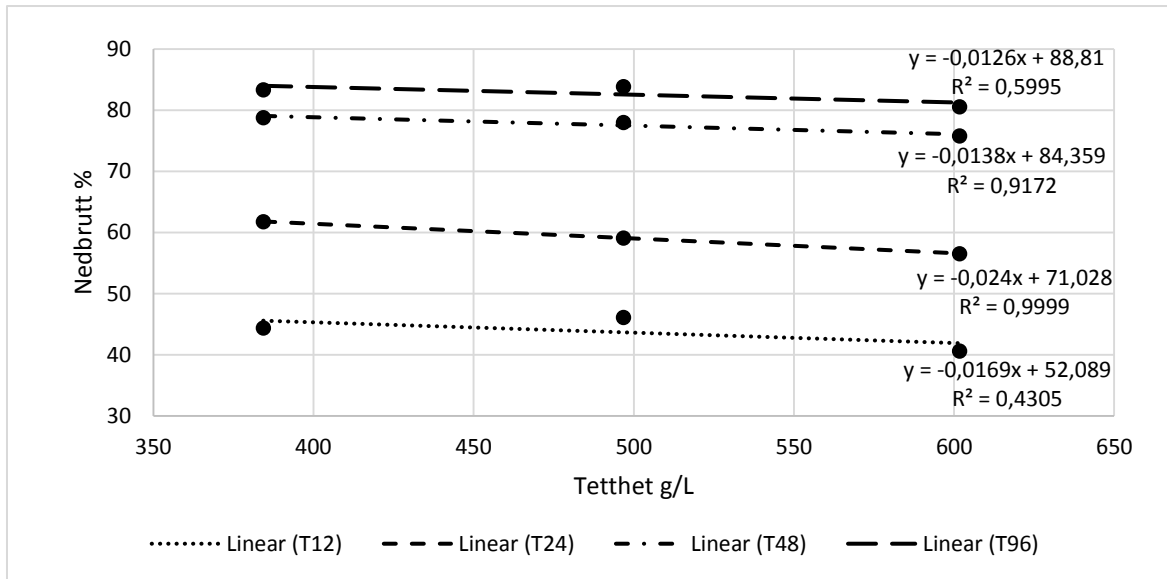
Figur 4.3, 4.4 og 4.5 angir henholdsvis sammenhengen mellom prosent nedbrutt og hardheten, vannstabiliteten og tettheten til pelleten.



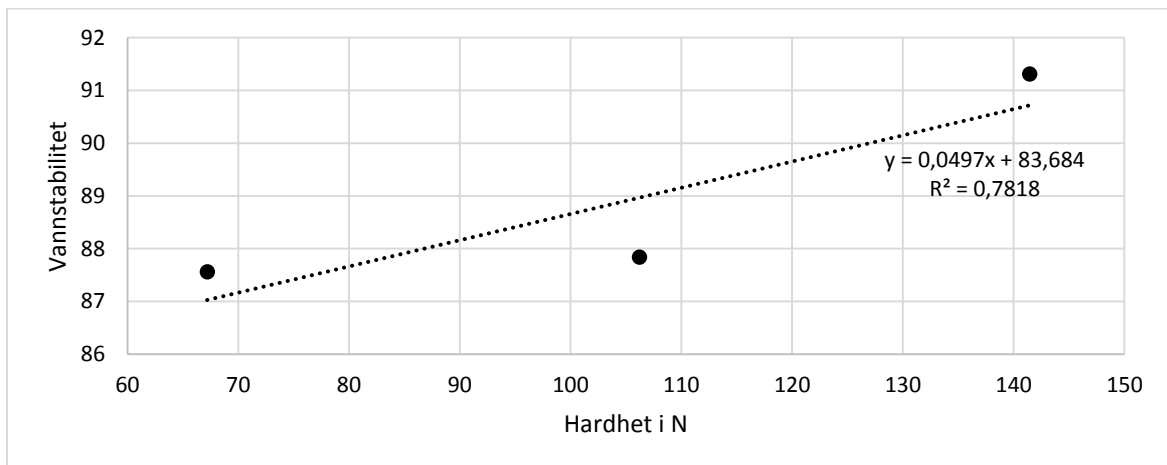
Figur 4.3: Sammenhengen mellom hardhet og % nedbrutt TS ved 12, 24, 48 og 96 timer. Hardheten til pellet målt i Newton



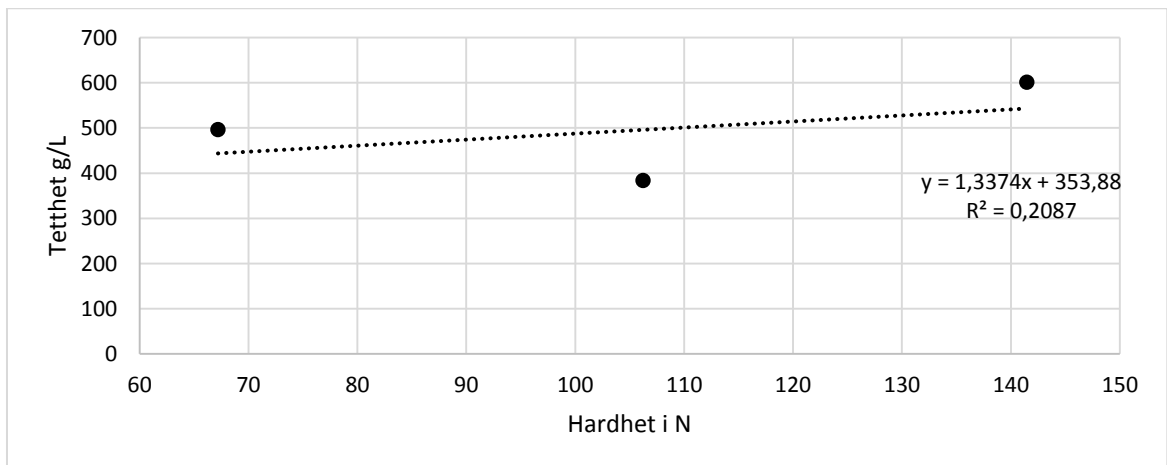
Figur 4.4: Sammenhengen mellom vannstabilitet og % nedbrutt TS ved 12, 24, 48 og 96 timer. Vannstabiliteten ble målt ved å inkubere i 120 min. i vomsaft ved 39°C.



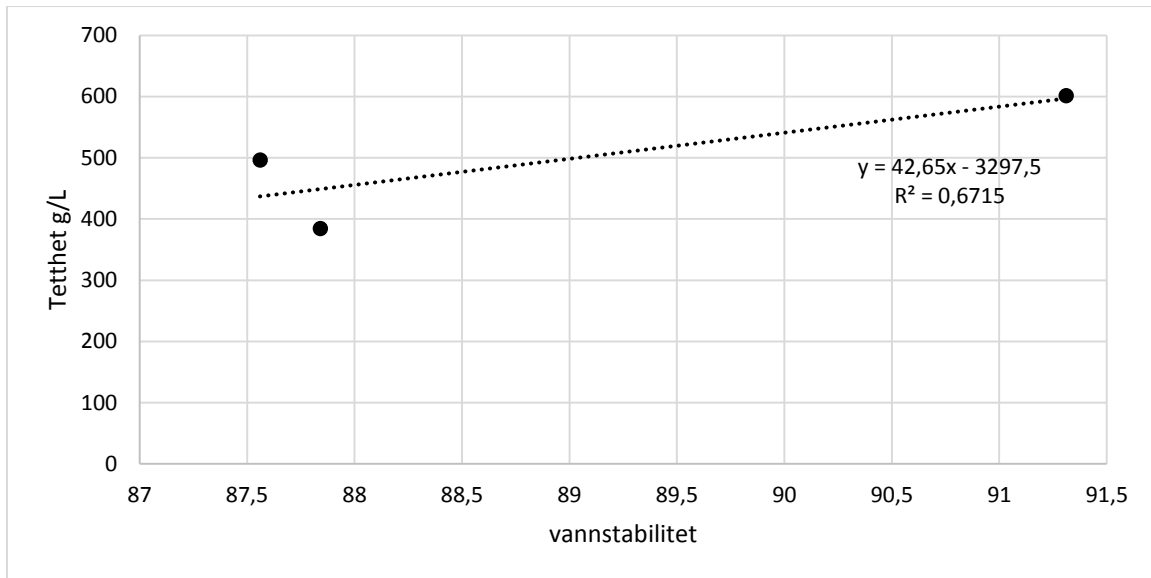
Figur 4.5: Sammenhengen mellom tetthet til pelleten i g/L og % nedbrutt TS ved 12, 24, 48 og 96 timer.



Figur 4.6: Sammenhengen mellom vannstabiliteten og hardheten til pelleten.



Figur 4.7: Sammenhengen mellom tettheten og hardheten i pelleten.



Figur 4.8: Sammenhengen mellom vannstabiliteten og tettheten til pelleten. Vannstabiliteten er oppgitt i % av opprinnelig fôr.

Figur 4.3: Bortsett fra T12 er det lite sammenheng mellom % nedbrutt TS og hardhet

Figur 4.4: Det er grei sammenheng mellom vannstabilitet og % nedbrutt TS bortsett fra T24

Figur 4.5: Varierende sammenheng mellom tetthet og % nedbrutt TS

Figur 4.6: Det er noe sammenheng mellom vannstabiliteten og hardheten til pelleten.

Figur 4.7: Det er lite sammenheng mellom tettheten og hardheten til pelleten.

Figur 4.8: Det er litt sammenheng mellom tetthet og vannstabilitet.

4.3 Nedbrytningshastighet i pelleten

Tabell 4.1 angir nedbrytningen av tørrstoff ved ulike inkubasjonstider i DAISY^{II} inkubatoren.

For å finne fordøyeligheten til pellets, ble både TS og stivelse målt.

Tabell 4.5 Fordøyd tørrstoff i % ved inkubasjonstid 12 timer – 96 timer (T12-T96).

	Fôr 1	Fôr 2	Fôr 3	Std. av	Effekt av	
					Fôr	Runde
T 12	46,1 ^a	40,7 ^b	44,4 ^a	2,4	0,002	<0,001
T 24	59,1 ^a	56,6 ^b	61,8 ^c	2,3	0,002	<0,001
T 48	78,0 ^a	75,8 ^b	78,8 ^a	1,2	0,001	<0,001
T 96	83,9 ^a	80,7 ^b	83,4 ^a	1,4	0,001	<0,001

^{a-c} = angir signifikant forskjell mellom runder (p<0,05)

Fordøyeligheten av tørrstoff i fôr 2 var signifikant lavere enn for fôr 1 og 3 (Tabell 4.1).

I den statistiske modellen som ble brukt for beregning av stivelse, er runde 2-8 inkludert ved 12 og 24 timer. Runde 2-5 er brukt til beregning av 48 og 96 timer fordi det var for lite prøvemateriale fra runde 6-8 etter inkubasjon til å analysere for stivelse.

Tabell 4.6 Fordøyd stivelse i % ved inkubasjonstid 12 timer – 96 timer (T12-T96). For T48 og T96 er kun runde 2-5 blitt brukt til beregningene.

	Fôr 1	Fôr 2	Fôr 3	Std. av	Effekt av	
					Fôr	Runde
T 12	66,5 ^a	59,2 ^b	65,1 ^a	3,8	0,009	0,001
T 24	76,1 ^a	74,2 ^a	84,0 ^b	4,7	0,005	0,007
T 48	94,0 ^a	92,0 ^b	96,3 ^a	1,6	0,005	0,008
T 96	97,8 ^a	94,6 ^b	98,0 ^a	1,2	0,010	0,188

^{a-b} = angir signifikant forskjell mellom runder (p<0,05)

Tabell 4.2 viser samme tendens som Tabell 4.1, at fôr 2 har lavest fordøyelighet, og at det er signifikant forskjell mellom fôr 2 og 3.

5 Diskusjon

For at en metode skal være god så må den gi repeterbare resultater mellom runder. Etter tre runder med forsøksfôr i ANKOM Daisy^{II} inkubator var det uventet stor variasjon i nedbrytningen av tørrstoff mellom rundene. Det ble kjørt to runder til uten at variasjonen ble redusert og det ble derfor bestemt å kjøre tre runder til der det i tillegg til forsøksfôret ble tatt med tre kvaliteter grovfôr. Det var signifikant forskjell ($p < 0,05$) i føyeligheten av grovfôr mellom rundene, men betydelig mindre variasjon sammenlignet med det pelleterte forsøksfôret. Dette stemmer med resultatene til Holden (1999) og Mabjeesh et al. (2000), som kom fram til at in vitro fordøyelighet med ANKOM Daisy^{II} inkubator en stabil måte å bestemme fordøyeligheten til grovfôr. Pedersen et al. (2000) kom fram til at ANKOM Daisy^{II} inkubatoren gir presise resultater for fordøyelighet av durra og mais, men både Mabjeesh et al. (2000) og Pedersen et al. (2000) brukte en tilpasset to trinns metode. Spanghero et al. (2010) kom derimot fram til at sikkerheten med ANKOM Daisy^{II} inkubatoren var bedre enn med in situ, men er likevel lite presis.

Noe av grunnen til at det er mindre variasjon i fordøyeligheten av grovfôr enn av pellet kan være fordi grovfôret var malt på 1 mm sold og dermed er mer homogent. Metoden som ble brukt er i tillegg utviklet for å finne fordøyeligheten til grovfôr, og kan dermed gi større variasjon i fordøyeligheten av kraftfôr (Vogel et al. 1999). Det kan hende at metoden må tilpasses når det er stivelsesrike fôr som blir undersøkt. En annen grunn til variasjonen i fordøyeligheten av forsøksfôret kan skyldes at hele pellets ble inkubert. Det er derfor mulig at stor variasjon i fysisk struktur mellom de enkelte pelletene, eller at de inneholdt hele korn og store partikler, kan ha påvirket fordøyeligheten av dem.

Noe av variasjonen mellom rundene kan komme av at det var stor variasjon i fysisk struktur mellom pellet av samme fôr. Under prosessering kom massen støtvis ut av ekstruderen, som kan være grunnen til variasjonen mellom pellet av samme fôr. Det faktum at pelletene ble inkubert hele og at det var hele korn i posene etter inkubering kan ha bidratt med tilfeldig variasjon mellom rundene. Hele korn kan ha stor påvirkning på resultatet når prøvene er så små.

Selv om det var signifikant forskjell i fordøyelighet av grovfôr mellom runder, er resultatet veldig viktige med hensyn på å vurdere om Ankom Daisy^{II} inkubatoren er egnet til å påvise forskjeller i nedbrytning mellom fôr. Det var konsistens i nedbrytningen innen grovfôr for de tre rundene, og variasjonen mellom runder var innen akseptabelt nivå. Det gjør det mulig å konkludere med at Ankom Daisy^{II} inkubator kan brukes til å påvise forskjeller i

nedbrytningsgrad mellom fôrtyper. For de tre typene pelletert fôr er en viktig konsekvens at en stor variasjon mellom runder gjør det vanskelig å påvise forskjeller mellom dem. Det er derfor viktig med standardiserte forhold for å redusere variasjonen mellom runder. Valg av poser er en slik faktor. I forsøket ble ANKOM F57 poser benyttet, og de gir ifølge Adesogan (2005) stabile resultater. Økt antall poser innen fôrslag kunne vært en måte å redusere variasjonen mellomrunder da det var en del variasjon også mellom poser innen runde.

Kanskje større poser som rommer mer kunne påvirket resultatet til å bli mer stabile. En annen mulig årsak til variasjon er vomsafta, som blir påvirket av rasjonssammensetningen dyrene får (Holden 1999). Derfor er standardiserte rutiner for rasjonssammensetning og uttak av vomsaft viktig. I forsøket ble det hentet ut vomsaft fra to kyr hver gang, men til litt ulik tid i forhold til fôring. Dette burde også vært standardisert. I tillegg var det vanskelig å følge eksakte rutiner hver runde i forbindelse med forberedelse av vomsafta til inkubasjon. Selv om dette nok har bidratt til økt variasjon er det imidlertid lite trolig at dette er hovedårsaken til variasjonen mellom runder for forsøkspelletene siden det ble rimelig bra for de tre rundene med grovfôr.

Pelletene i runde 6 og 7 hadde mye høyere fordøyelighet ved 12 og 24 timen enn de øvrige rundene. Det er usikkert hva dette kommer av.

I følge Holden (1999) har det ingen betydning at det både er grovfôrprøver og kraftfôrprøver i samme inkubasjonsglass.

Forsøket så også på om den fysiske strukturen til pelletene påvirket fordøyeligheten av tørrstoff og stivelse. De tre pelletene hadde høy, middels og lav tetthet. Pelletene med høyest tetthet (fôr 2) har den laveste nedbrytingen av TS og stivelse målt in vitro. Det er også denne pelleten som er mest vannstabil og hardest. Fôr 2 ble ekstrudert med lav RPM og med lav temperatur i seksjon 5. Det dette ga en masse som var seig og ekspanderte lite ut av ekstruderen. Fôr 1 kom også ut av ekstruderen i lav hastighet, men varm, og ekspanderte derfor en del. Fôr 3 ekspanderte derimot mye fordi den kom varm ut av ekstruderen i stor hastighet. Ekspanderingen er et resultat av at kokende vann blir til gass når massen kommer ut av ekstruderen og trykket forsvinner. Under prosesseringen av alle tre forsøksfôrene var det over 80°C og nok vann til at stivelsen ble forklistret (Svihus et al. 2005). Normalt vil forklistring av stivelse gi økt nedbrytning av stivelse i vom selv om dataene på det ikke er fullstendige (Svihus et al. 2005). For eksempel fant Offner et al. (2003) i in situ forsøk, lavere nedbrytning av stivelse i vom for ekstrudert bygg enn for malt bygg. Data fra Larsen et al. (2009) indikerer også at effekten av prosessering på nedbrytning av stivelse i vom kan være variabel.

Fôr 1 og 3 hadde lavest tetthet, og dermed mye porer i pelleten kan gjøre det enklere for vann å trenge inn. Dette er i samsvar med at de hadde høyere fordøyelighet enn fôr 2. Hardheten ser ut til å bety mindre for fordøyeligheten. Fordi fôr 2 har lavest fordøyelighet i vom også ved 96 timers inkubering, kan det hende at tarmfordøyeligheten også er lavere.

Fordi fordøyeligheten varierte mye mellom runder, er det vanskelig å fastslå eksakt in vitro fordøyeligheten til forsøksfôrene. Til tross for variasjonen mellom runder hadde fôr 2 signifikant lavere fordøyelighet av TS og stivelses enn fôr 1 og 3. Dette fordi resultatene var konsistente ved at fôr 2 hadde lavest fordøyelighet innad i hver runde. Siden stivelsen i alle 3 forsøksfôrene antagelig ble forklart, er det sannsynlig at den reduserte nedbrytningen av tørrstoff og stivelse i fôr 2 skyldes høyere tetthet og økt vannstabilitet enn i fôr 1 og 3.

6 Konklusjon

Den fysiske strukturen til pelleten påvirker fordøyeligheten. En vannstabil pellet med høy tetthet har lavere fordøyelighet i vom, enn en pellet med lav tetthet og lavere vannstabilitet.

In vitro metoden til ANKOM Daisy^{II} inkubatoren er fungerer dårlig til å bestemme fordøyeligheten i hele pellets. For å bruke denne inkubatoren til å finne in vitro fordøyelighet, må metoden tilpasset til hele pellet.

Kilder:

- Adesogan, A. (2005). Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM DaisyII incubators. *Animal feed science and technology*, 119 (3-4): 333-344.
- Harstad, O. M., Nedkvitne, J. J., Pedersen, A.-T., Selmer-Olsen, I., Sundstøl, F., Kjos, N. P. & Steinshamn, H. (1994). *Grovfôr*. Norges Landbrukshøyskole: Landbruksbokhandelen.
- Holden, L. (1999). Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, 82 (8): 1791-1794.
- Hvelplund, T. & Nørgard, N. (2003). *Kvægets ernæring og fysiologi*: Bind.
- Khan, G. Q. (2018).
- Larsen, M., Lund, P., Weisbjerg, M. & Hvelplund, T. (2009). Digestion site of starch from cereals and legumes in lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 153 (3-4): 236-248.
- 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.
- 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.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. & Wilkinson, R. G. (2011). *Animal nutrition*. 7th ed. utg. Harlow: Prentice Hall.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., Cox, M. M. & Lehninger, A. L. (2013). *Lehninger principles of biochemistry*. 6th ed. utg. New York: W.H. Freeman.
- 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.
- NorFor. (2018). Feed Table. Tilgjengelig fra: <http://feedstuffs.norfor.info/> (lest 13.04.2018).
- Offner, A., Bach, A. & Sauvant, D. (2003). Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 106 (1-4): 81-93.
- Pedersen, J. F., Milton, T. & Mass, R. (2000). A twelve-hour in vitro procedure for sorghum grain feed quality assessment. *Crop science*, 40 (1): 204-208.
- Seppänen-Laakso, T., Laakso, I. & Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465 (1-2): 39-62.
- Sjaastad, Ø. V., Hove, K. & Sand, O. (2016). *Physiology of domestic animals*. 3rd ed. utg. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.

- Spanghero, M., Berzaghi, P., Fortina, R., Masoero, F., Rapetti, L., Zanfi, C., Tassone, S., Gallo, A., Colombini, S. & Ferlito, J. (2010). Precision and accuracy of in vitro digestion of neutral detergent fiber and predicted net energy of lactation content of fibrous feeds. *Journal of dairy science*, 93 (10): 4855-4859.
- 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.
- Svihus, B., Uhlen, A. K. & Harstad, O. M. (2005). Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 122 (3): 303-320.
- Svihus, B. (2017). *Forelesing i HFE303 Ernæring og optimalisering av forrasjoner til enmaga dyr*.
- 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.
- Vogel, K. P., Pedersen, J. F., Masterson, S. D. & Toy, J. J. (1999). Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. *Crop Science*, 39 (1): 276-279.
- Volden, H. (2011). *NorFor- The Nordic feed evaluation system*: Wageningen Academic Publishers.
- Wattiaux, M. A. (1998). *Technical dairy guide: nutrition and feeding*: Babcock Institute for International Dairy Research and Development.
- 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.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway