

PROTOCOL{PRIVATE }

VOOR *IN SITU* PENSINCUBATIE

BEPALING VAN AFBRAAKSNELHEID EN UITWASBARE FRACTIES VAN EIWIT, ZETMEEL, CELWANDEN EN ORGANISCHE RESTFRACTIE

Vastgesteld door de Begeleidingscommissie van het CVB
op 10 december 2003

Proeven met voedermiddelen, die worden uitgevoerd met de bedoeling dat de uitkomsten ervan worden betrokken bij het vaststellen van de waarden gepubliceerd in de Veevoedertabel van het CVB, dienen conform dit protocol te worden uitgevoerd.

BEPALING VAN AFBRAAKSNELHEID EN UITWASBARE FRACTIES VAN EIWIT, ZETMEEL, CELWANDEN EN ORGANISCHE RESTFRACTIE

1. Doel

Voor huidige en toekomstige voederwaardingssystemen voor herkauwers is kennis nodig van de mate en de snelheid waarin organische voederbestanddelen in de pens worden afgebroken. In combinatie met de passagesnelheid van voerdeeltjes uit de pens en de verteerbaarheid in de dunne darm kan daaruit berekend worden welke nutriënten voor de herkauwer beschikbaar komen. De *in situ* techniek is de referentiemethode voor het meten van de afbraak in de pens.

2. Principe

Via de *in situ* techniek wordt vastgesteld welke fractie van een voercomponent onder gedefinieerde omstandigheden uitwasbaar is (W), welke fractie ook na langdurige incubatie in de pens niet wordt afgebroken (U) en met welke snelheid de resterende fractie ($D = 1 - W - U$) wordt afgebroken. Deze bepalingen kunnen worden uitgevoerd aan eiwit, zetmeel, celwanden en organische restfractie (= organische stof minus eiwit, zetmeel, celwanden, suikers en vet). Van suikers en vet wordt aangenomen dat deze uit nylon zakjes in de pens worden uitgespoeld, zodat daarvan geen afbraakkenmerken worden bepaald. De fractionele verdeling en de afbraaksnelheid worden bepaald door kleine hoeveelheden van een voedermiddel in nylon zakjes uit te wassen, respectievelijk in de pens te incuberen, waarbij variatie wordt aangebracht in de duur van die incubaties. De uitwasbare fractie van eiwit wordt chemisch onderscheiden in fijn verdeeld niet-oplosbaar eiwit, oplosbaar werkelijk eiwit en NPN en de uitwasbare fractie van zetmeel in fijn verdeeld niet-oplosbaar zetmeel en in water oplosbare, maar in 40% ethanol onoplosbare oligo- en polysachariden. De afbraaksnelheid wordt met behulp van een rekenprogramma afgeleid uit de analyseresultaten van de incubatieresten. Bij elke incubatie wordt een ijkmonster meegenomen.

3. Benodigheden

3.1 Laboratoriumapparatuur

Normale laboratoriumapparatuur en meer specifiek een weegschaal met een uitleesbaarheid tot 1 mg, een vriesdroger, een droogstoof en een papiersnijder of een schaar om ruwvoeders te kunnen verkleinen.

3.2 Nylon zakjes

Het te gebruiken gaas is van polyamide en wordt gespecificeerd met een getal voor de poriëngrootte in micron en een doorlaatbaarheid in procenten. De materialen PA 37/24, PA 38/22, PA 40/30 en PA 41/31 zijn geschikt en leveren onderling vergelijkbare resultaten op ten aanzien van de uitwasbaarheid van een zetmeelrijk (tarwe) en eiwitrijk (sojaschroot) voedermiddel (zie bijlage 1).

Een zakje wordt gemaakt door een stukje gaas in de lengte om te vouwen en aan één korte zijde en de open lange zijde dicht te sealen of met een dubbele naad te stikken. Als uit ervaring blijkt dat de naad niet sterk genoeg is of dat er door het stikken kans is op verlies van inhoud uit de zakjes, kan de seal- of stiknaad eventueel met een daartoe geschikte lijm bedekt worden. De afmetingen van de zakjes worden bepaald door de hoeveelheid in te wegen droge stof. Het verdient aanbeveling de zakjes slechts eenmalig te gebruiken (zie bijlage 2; par. 3.2).

3.3 Bevestigingskoord, net en gewicht.

Nylon zakjes met inhoud worden in de pens gebracht door ze in een grofmazig net te leggen, dat vervolgens met een gewicht wordt verzwaard of door ze met korte verbindingen aan een blok te bevestigen. Het blok wordt met een koord aan de afsluitdop van de pensfistel bevestigd. Het koord heeft een zodanige lengte dat de afstand van de penscanule tot de monsterzakjes in rechte lijn gemeten 1 meter is. Het gewicht of blok moet van inert materiaal zijn (bijvoorbeeld van massief kunststof of van roestvrij staal) en moet tussen 1,5 en 2 kg wegen.

3.4 Afsluit- en markeringsmateriaal

Zakjes kunnen afgesloten worden met koordjes of trekbandjes. De zakjes kunnen gelabeld of beschreven worden, waarbij gebruik gemaakt moet worden van watervaste markeerstiften.

3.5 Emmer met ijswater

Een emmer wordt gevuld met smeltend ijswater.

3.6 Wasautomaat

De wasautomaat moet geschikt zijn om een wolwasprogramma met (minimaal) 4 spoelingen uit te voeren waarbij was- en spoelwater kunnen worden afgepompt zonder tussentijds centrifugeren. Het verdient aanbeveling om tussen de watertoevoer en de wasautomaat een watermeter te plaatsen (zie bijlage 2; par. 3.6).

4. Werkwijze

4.1 Proefplan en vastlegging proefverloop

Proefuitvoering vindt plaats op basis van een tussen opdrachtgever en opdrachtnemer geaccordeerd proefplan. In het proefplan worden die gegevens vermeld waarvan dit protocol expliciet aangeeft dat ze hierin moeten worden beschreven.

Alle gegevens die voor een verantwoorde interpretatie en rapportage van de proef nodig zijn worden vastgelegd.

4.2 Dieren

De proeven worden uitgevoerd met minimaal 3 HF melkkoeien - voorzien van een grote penscannule (10 cm i.d.), Bar-Diamond, Parma, ID, USA of penscannules die daarmee vergelijkbaar zijn) - die minimaal 15 kg melk per dag produceren.

4.3 Huisvesting

De dieren worden gehuisvest onder omstandigheden die een gecontroleerde individuele voeding en verzorging garanderen.

4.4 Rantsoen en voersysteem

Het rantsoen moet aangepast worden aan het productieniveau. Daarbij gelden de volgende randvoorwaarden:

- het aandeel ruwvoer mag variëren tussen 40% en 70%
- het ruwvoer moet een combinatie zijn van grassilage en snijmaïssilage in een verhouding van ongeveer 1:1 op DS-basis; bij studie van gras als proefvoer of proefvoerders in combinatie met gras kan de voorkeur worden gegeven aan gras als basisvoer
- de hoeveelheid suiker plus onbestendig zetmeel (zie bijlage 2; par. 4.4) moet tussen 145 en 185 g per kg droge stof rantsoen liggen.

Door middel van het voersysteem wordt een zo constant mogelijk pensmilieu gecreëerd zodat op elk moment van de dag een incubatie kan worden begonnen. Daartoe wordt het ruwvoer verstrekt in twee qua grootte en samenstelling vergelijkbare porties per dag en het krachtvoer gespreid over de dag in porties van niet meer dan 2 kg per keer. Eventueel kan het krachtvoer met ruwvoer gemengd (TMR) in twee porties per dag worden verstrekt.

De per dier per dag te verstrekken hoeveelheid krachtvoer wordt voor de duur van de proef, inclusief 2 daaraan voorafgaande weken, gefixeerd, dan wel (licht) aangepast aan de productietrend. Water moet steeds onbeperkt beschikbaar zijn.

4.5 Proefvoerders en referentiemonsters

4.5.1 Proefvoerders

Een proefvoeder kan een enkelvoudig (vochtrijk) voedermiddel, ruwvoeder of voermengsel zijn. Een te onderzoeken proefvoeder kan door de opdrachtgever aan de onderzoekinstelling worden aangeleverd dan wel op diens verzoek uit de markt worden betrokken. In het laatste geval dienen afspraken te worden gemaakt tussen opdrachtgever en opdrachtnemer ten aanzien van de criteria waaraan moet worden voldaan. Voor een mengvoergrondstof gelden de volgende criteria:

- De zuiverheid moet voldoen aan de criteria beschreven in de "Lijst van enkelvoudige diervoedergrondstoffen" (CVB, 1994);
- De herkomst moet zoveel mogelijk omschreven zijn (land, ras, aard productieproces etc.);

Afhankelijk van de te onderzoeken grondstof en het doel van het onderzoek kunnen nadere (analytische) eisen worden gesteld.

4.5.2 Referentiemonster

Bij een incubatie van proefvoerders wordt een referentiemonster meegenomen. Voor incubaties van krachtvoerders en ruwvoerders wordt hetzelfde referentiemonster gebruikt. Het referentiemonster is een mengsel van 30% sojaschroot (RE 47%), 35% kiemenarm maïsmeel en 35% suikerarm grasmeel. Dit mengsel bevat per kg ca. 230 g ruw eiwit, ca. 220 g NDF, en ca. 220 g zetmeel.

Verpakkingen van het referentiemonster worden in opdracht van het CVB centraal aangemaakt. De drie grondstoffen worden eerst apart gemalen over een 3 mm zeef en daarna zorgvuldig gemengd in bovengenoemde gewichtsverhouding. Hiervan zijn identieke submonsters gemaakt in hoeveelheden die geschikt zijn voor een incubatie met 7 incubatietijden bij gebruik van drie koeien (500 g/zak). Centrale opslag in opdracht van het CVB vindt plaats bij 4 °C in afgesloten dozen in een (donkere) koelcel. Bij afnemers dienen de monsters, indien opslag voor langere tijd plaatsvindt, op dezelfde manier te worden opgeslagen.

4.6 Voorbehandeling proefvoeder

Droge krachtvoerders worden eerst gemalen over een zeef van 3 mm; bij vetrijke voeders (>100 g/kg DS) wordt voorontvet door koud schudden met petroleumether. Technologisch behandelde krachtvoerders of grondstoffen moeten soms anders voorbehandeld worden (zie bijlage 2; par. 4.6.1.). Ruwvoerders (zowel droge als vochtrijke) en wortel- en knolgewassen en dergelijke worden vers of na invriezen met behulp van een papiersnijder of een schaar verkleind (maximale deeltjeslengte 1 cm). (zie bijlage 2; par. 4.6.2)

Vochtrijke industriële krachtvoerders ondergaan geen verdere behandeling tenzij de deeltjes groter zijn dan 1 cm³.

Na voorbehandeling worden monsters afgewogen en overgebracht in nylon zakjes (**par. 3.2**). Per zakje wordt een hoeveelheid afgewogen overeenkomend met een vulling van minimaal 30 en maximaal 16 mg droge stof per cm² effectief inwendig oppervlak (het tweezijdige oppervlak van het

zakje na afsluiten). Voor incubaties van 72 uur en langer mag de vulling gebaseerd zijn op maximaal 32 mg droge stof per cm² effectief oppervlak. De maatvoering van de zakjes mag variabel zijn maar wordt afgestemd op maximaal 5 g droge stof.

Daarna worden de zakjes afgesloten met nylon koord of een trekbandje. Eventueel worden de zakjes dan met koordjes aan een gewicht bevestigd. Zakjes met inhoud worden tot het moment van incubatie dusdanig opgeslagen dat geen omzettingen van de inhoud plaatsvinden.

4.7 Incubatie

Het bij de incubaties te gebruiken schema (dag en tijdstippen van inbrengen en uithalen van de zakjes, het aantal herhalingen per tijdsduur en het aantal betrokken dieren) wordt weergegeven in het proefplan.

Voor iedere organische component in het proefvoeder waarvoor de afbraakkenmerken moeten worden bepaald, wordt uitgegaan van minimaal 5 verschillende verblijftijden in de pens, waarbij in elk geval een tijd van ten minste 336 uur (levert de niet-fermenteerbare fractie = U). Verder wordt de uitwasbare fractie (W) bepaald. Van de inhoud van ten minste drie zakjes wordt de uitwasbaarheid zonder pensincubatie bepaald. Het te kiezen incubatieschema is voorts afhankelijk van de verwachte afbraaksnelheid en van de vraag of de darmverteerbaarheid van een pensresidu bepaald moet worden (zie bijlage 2; par. 4.7.1).

Als in een voedermiddel alleen de afbreekbaarheid van celwanden wordt bepaald kan de bepaling van de uitwasbaarheid achterwege blijven. Per dier per tijdsduur worden 2 zakjes-met-inhoud geïncubeerd, tenzij op grond van de voor de chemische analyses noodzakelijke hoeveelheid incubatieresidu een groter aantal nodig is.

Om bij incubaties zoveel mogelijk vergelijkbare omstandigheden te creëren moeten bij de start van een incubatie 20 tot 35 zakjes in de pens aanwezig zijn. Bij langdurige incubaties (72 uur en meer) mogen meer zakjes in de pens aanwezig zijn. (zie bijlage 2; par. 4.7.2). Als in het kader van een onderzoek meer dan één voeder op afbraakkenmerken onderzocht moet worden, moeten zo mogelijk per incubatietijd alle voeders gelijktijdig geïncubeerd worden, met inachtneming van het maximum toelaatbare aantal zakjes.

Daartoe in aanmerking komende zakjes met inhoud worden, bevestigd aan een zgn. incubatieblok of op een daarmee vergelijkbare manier, in de pens gebracht en daaruit na de vastgestelde tijd weer verwijderd. Om te bewerkstelligen dat het te incuberen materiaal in de ventrale penszak terecht komt, wordt een blokgewicht van 1,5 tot 2 kg gebruikt. De zakjes worden na verwijdering uit de pens ter plekke direct ondergedompeld in ijswater. Op het laboratorium worden ze ontdaan van aanhangende bestanddelen door ze in ijswater te spoelen. Daarna worden de zakjes ingevroren (zie bijlage 2; par. 4.7.3). Vervolgens worden de bevroren zakjes (eventueel uit praktische overwegingen na tussentijdse opslag in de diepvries) in een wasmachine (**par. 3.6**) volgens een standaard wolwasprogramma met onverwarmd water gewassen, zonder te centrifugeren. Zakjes-met-inhoud die alleen aan de spoelprocedure worden onderworpen, worden bij voorkeur apart uitgewassen (zie bijlage 2; par. 4.7.4).

Na wassen worden de zakjes-met-inhoud gedroogd en vervolgens teruggewogen (zie bijlage 2; par. 4.7.5). Drogen met hete lucht bij ca. 70 °C is de standaardprocedure; voor de bepaling van celwandafbraak en/of indien tevens de darmverteerbaarheid van het eiwit dient te worden gemeten, worden de uitgewassen zakjes met inhoud gevriesdroogd, zodanig dat de inhoud na maximaal 16 uur droog is.

4.8 Bepaling en karakterisering van de uitwasbare fractie

Afhankelijk van het onderzoek kan het noodzakelijk zijn om in aanvulling op de bepaling van de eiwitafbreekbaarheid de uitwasbare fractie kwantitatief te scheiden in de fracties uitwasbaar niet-oplosbaar eiwit (NS), uitwasbaar oplosbaar werkelijk eiwit (TP = true protein) en NPN, waarbij NPN desgewenst nog onderscheiden kan worden in aminozuren, ammonia en dergelijke. Ook de uitwasbare zetmeelfractie kan fijn verdeeld niet-oplosbaar materiaal bevatten. De fractie NS moet altijd bepaald worden bij de bepaling van de afbreekbaarheid van eiwit ($NS = W - TP - NPN$) en zetmeel ($NS = W - ZET\text{-oplosbaar}$).

Weeg, na voorbehandeling (**par. 4.6**) van de droge voedermiddelen monsters van 3 g af en van vochtige ruwvoerders, wortel- en knolgewassen en dergelijke monsters van 5 g (of zoveel als overeenkomt met minimaal 2,5 g droge stof) af in centrifugebekers van 250 ml. Zet elke bepaling in 3-voud in. Voeg precies 75 ml leidingwater toe (*zie bijlage 2; par. 4.8.1*) en schud gedurende 30 minuten in een schudmachine die vlak voor het begin wordt gevuld met leidingwater. Centrifugeer daarna gedurende 20 minuten bij tenminste 3500 x g (*zie bijlage 2; par. 4.8.2*).

Neem een representatief monster van de bovenstaande vloeistof en bepaal daarin eiwit en/of zetmeel. Bereken, uitgaande van een volume van de bovenstaande vloeistof van 75 ml daaruit het gehalte oplosbaar eiwit en/of zetmeel in het monster en druk deze hoeveelheid uit in een fractie van het eiwit en/of zetmeel in het oorspronkelijke materiaal (de fractie S).¹

Als de fractie oplosbaar werkelijk eiwit nader gekarakteriseerd moet worden, moeten een of meer extra representatieve monsters uit de bovenstaande vloeistof worden genomen. Oplosbaar werkelijk eiwit kan bepaald worden na neerslaan van het eiwit met trichloorazijnzuur. Verder kunnen andere N-verbindingen (aminozuren, ammonia en dergelijke) volgens desbetreffende standaardvoorschriften bepaald worden.

4.9 Verzameling en bemonstering van voer en incubatieresiduen

Tijdens het afwegen van het proefvoeder worden overeenkomstig daartoe strekkende werkvoorschriften monsters genomen ten behoeve van laboratoriumanalyses. De bemonstering moet minstens voldoen aan normvoorschrift ISO/DIS 6497 c.q. de beschrijving in de Handleiding Voederwaardeberekening Ruwvoerders (CVB, 2002).

Na de incubatie vindt een beoordeling van de betrouwbaarheid van de waarnemingen plaats op basis van de droge stof residuen. Er zijn 6 of 9 residuen per incubatietijd (3 koeien en 2 of 3 zakjes per incubatietijd). Als uitbijtertoets wordt de Dixon Q-test gebruikt (*zie bijlage 2; par. 4.9*). Indien één van de twee of drie residuen per koe per tijdseenheid groter is dan het gemiddelde residu van de in de tijd voorafgaande incubatie bij dezelfde koe, wordt dat residu óók verworpen als de Dixon Q-test de waarde niet uitsluit. Na verwijdering van de uitbijters worden de incubatieresiduen ten behoeve van verdere analyses per tijdsduur samengevoegd en verder geanalyseerd.

De uitwasbaarheid van het monster is altijd het gemiddelde van de bepaling van minimaal een 3-voud.

Om te voorkomen dat een deel van het per tijdsduur samengevoegde monster later gebruikt moet worden voor een bepaling van de droge stof in luchtdroge stof, kan men als volgt te werk gaan. Laat de gedroogde zakjes met inhoud na de weging aan de lucht equilibreren. Weeg daarna opnieuw en voeg de inhoud van de zakjes per tijdsduur kwantitatief samen. Bereken het gehalte aan luchtdroge stof in het samengevoegde monster. Daarna kan de inweeg voor de chemische

¹ De bepalingen in de bovenstaande vloeistof kunnen in enkelvoud worden ingezet, omdat de schudprocedure al in 3-voud wordt uitgevoerd.

bepalingen vanuit het luchtdroge materiaal plaatsvinden.

4.10 Laboratoriumanalyses in voer en incubatieresiduen

Voorbehandeling van en (chemische) bepalingen in monsters voer en incubatieresiduen vinden plaats overeenkomstig van kracht zijnde normvoorschriften. De in het proefvoeder en de incubatieresiduen standaard uit te voeren analyses staan - met de daarbij te gebruiken methode - vermeld in tabel 1 ([zie bijlage 2; par. 4.10.1](#)).

Tabel 1. Overzicht van standaard uit te voeren analyses in voer en incubatieresiduen

soort bepaling	voorschrift/methode	Voer	incubatieresidu
droge stof	NEN-ISO 6492 (1999); en	X	X
ruwe as	NEN-ISO 5984 (2002); nl	X	X
ruw eiwit	Kjeldahl: NEN-ISO 5983 (1998); en Dumas ¹	X	X
ruw vet	NEN-ISO 6492 (1999); en	X	³
Suiker ²	NEN 3571	X	³
zetmeel	enzymatisch: ISO-DIS 15914 (2002)	X	X
NDF	Produktschap voor Veevoeder; Kwaliteitsreeks nr. 19, 1992	X	X ⁴

¹ Om milieutechnische redenen wordt de methode Dumas geadviseerd. De Dumas methode is als horizontale ISO-methode in ontwikkeling. Werktitel: "Cereals, pulses, milled cereal products, oil seeds, oil seed residues and animal feeding stuffs – Determination of total nitrogen and crude protein by combustion according to the Dumas principle".

² Bij ruwvoerders wordt gesproken van water oplosbare koolhydraten (WOK). Deze worden bepaald als reducerende suikers na onteiwitten van een waterig extract. Ook hier wordt de Luff-Schoorl methode toegepast.

³ Van suikers en vet wordt aangenomen dat deze uit nylon zakjes in de pens worden uitgespoeld.

⁴ NDF wordt niet altijd bepaald ([zie bijlage 2; par. 4.10](#))

Afhankelijk van het voedermiddel is het soms voldoende om de hoeveelheid NDF in het incubatieresidu te berekenen uit (OS – RE – Zetmeel) in plaats van deze te bepalen ([zie bijlage 2; par. 4.10.2](#)).

Afhankelijk van eisen van de kant van de opdrachtgever of van het CVB als het gaat om onderzoek ten behoeve van registratie in de Veevoedertabel kunnen aanvullende bepalingen uitgevoerd worden, zoals die van ruwe celstof, ADF en ADL, pectines etc. en *in vitro* bepalingen. De bepalingen moeten gebaseerd zijn op in PDV-verband geaccordeerde methoden of, bij het ontbreken daarvan, door het CVB geaccordeerde analysemethoden.

Analyses in proefvoerders worden (minstens) in tweevoud uitgevoerd. Voor het uitvoeren van heranalyses bij onaanvaardbare verschillen tussen duplo-waarden dienen per laboratorium voldoende gewaarborgde regels in het kader van GLP, Sterlab of andere certificering te gelden.

5. Resultaten

5.1 Berekening

Berekening van de afbraakmerken van componenten in het proefvoer vindt plaats met een

rekenprogramma voor curve-fitting waarbij via iteratie uit de residuen per tijdseenheid de afbraaksnelheid wordt berekend. Daarbij wordt het residu na uitwassen als waarneming voor 0 uur meegenomen. De curve-fitting voor elke nutriënt is gebaseerd op het model: $R(t) = F_d \times e^{(-k_d \times t)} + F_r$, waarbij R staat voor de fractie van een nutriënt die op tijdstip t nog als residu wordt teruggevonden, F_d de potentieel afbreekbare fractie is en F_r de fractie die volgens het exponentiële model als asymptoot (schatter van de niet-afbreekbare fractie) wordt berekend. Het rekenprogramma fixeert de fractie F_r echter op de gemeten waarde na de langste incubatietijd (= U). k_d is de afbraakconstante en t is de incubatieduur (uren). De curve-fitting resulteert dan in een waarde voor de afbraakconstante en voor de fractie F_d (zie bijlage 2; 5.1.1).

Om de reproduceerbaarheid in de tijd binnen laboratoria en de reproduceerbaarheid tussen laboratoria te maximaliseren wordt bij elke incubatie van een of meer proefvoerders het referentiemonster (par. 4.5.2) gelijktijdig geïncubeerd. De waarde van de gevonden afbraakconstante k_d voor eiwit en/of zetmeel en/of NDF in verhouding tot de gemiddelde waarde over laboratoria en op verschillende data gemeten is een maatstaf voor de mate waarin het gemiddelde fermentatieniveau bij de gebruikte proefkoeien afwijkt van het gemiddelde.

Omdat de uitwasbaarheid (= W) ook een gemeten waarde is die bij de curve-fitting wordt gebruikt, moet deze ook voor het referentiemonster steeds opnieuw worden vastgesteld. De waarde mag niet meer dan $\pm 2 \times s_d$ afwijken van het gemiddelde. Als dat wel het geval is moet de uitwasbaarheid opnieuw minimaal in 3-voud worden bepaald. Het gemiddelde van W van het referentiemonster wordt gebruikt voor de curve-fitting van dat monster (zie bijlage 2; 5.1.2).

De correctiefactor voor de gemeten k_d van een component uit een proefvoer is de verhouding tussen de gemeten k_d van die component uit het referentiemonster en de gemiddelde k_d voor het referentiemonster zoals die op dat moment in de databank van het CVB vastligt: correctiefactor = $k_{d \text{ (gemeten)}} / k_{d \text{ (databank)}}$. De gemeten k_d voor een component uit een proefvoer wordt met deze correctiefactor vermenigvuldigd.

In het kader van het DVE-systeem kan het gewenst zijn het bestendigheidsperscentage van ruw eiwit en/of zetmeel te berekenen. Hierbij wordt aangenomen dat de meetwaarde na de langste incubatie de U-fractie vormt; $D = 1 - W - U$. k_d wordt afgeleid als hiervoor is aangegeven.

De formule voor de procentuele bestendigheid luidt:

$$\% \text{Best.} = D \times k_p / (k_p + k_d) + U$$

Bij de bepaling van de afbreekbaarheid van celwanden wordt aangenomen dat $W = 0$.

Bij de berekening van de bestendigheid van zetmeel wordt aangenomen dat $U = 0$; in het DVE-systeem wordt verder aan de W fractie een bestendigheid toegekend van 10%. De formule voor het berekenen van de bestendigheid van zetmeel wordt daarmee:

$$\% \text{Best.} = 0,1 \times W + D \times k_p / (k_p + k_d)$$

(zie bijlage 2: 5.1.3)

5.2 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

De beoordeling van de herhaalbaarheid van de resultaten na de incubatie betreft de variatie in de droge stof residuen binnen de individuele zakjes (zie par. 4.9) Over de reproduceerbaarheid, dat wil zeggen de toelaatbare verschillen tussen laboratoria kan dit protocol geen uitspraak doen omdat er geen ringtest is uitgevoerd. Verschillen tussen laboratoria worden geminimaliseerd door

het gebruik van hetzelfde referentiemateriaal en een uniforme correctieprocedure.

5.3 Verslaglegging

Een samenvatting van de proefuitkomsten wordt weergegeven in een vast printformaat. Analytische gehalten worden weergegeven in g per kg (voorzover relevant in de droge stof), fracties W, S, D en U als percentage van het ingewogen gewicht (géén decimaal) en afbraaksnelheid k_d als percentage per uur (één decimaal); voederwaarden in de daartoe in CVB-verband afgesproken eenheden.

Rapportage van de resultaten behelst in elk geval:

- Omschrijving van de gebruikte dieren (o.a. aantal, leeftijd, productieniveau);
- Omschrijving van het verstrekte rantsoen en informatie over de verstrekte hoeveelheid en de chemische samenstelling van de rantsoencomponenten;
- Karakterisering van proefvoeder(s) en weergave van de resultaten van verrichte analyses in onderzochte proefvoeder(s);
- De verdwijningspercentages per incubatietijdstip van de onderzochte componenten van het referentiemonster en het onderzochte proefvoeder(s). In een bijlage worden de verdwijningspercentages van de droge stof per dier gegeven met eventuele uitbijters;
- De correctiefactor(en) voor de afbraakconstante(n) van de D-fractie(s) op grond van de uitkomsten van het referentiemonster; hierbij dient tevens te worden vermeld welke – aan de databank ontleende – gemiddelde waarde(n) is aangehouden;
- De fracties W, S, U en D en de afbraakconstante van D, van referentiemonster en proefvoeder(s); voor de afbraakconstante(n) van D worden zowel de ongecorrigeerde als de gecorrigeerde waarden vermeld;
- Eventuele bijzonderheden de proef betreffende.

6. Bewaring

Analyseklaar (luchtdroog) gemaakte monsters van het proefvoeder worden ten behoeve van eventueel later uit te voeren aanvullende analyses minstens 5 jaar bewaard in een daartoe geschikt monstermagazijn. Analyseklaar gemaakte monsters incubatieresidu worden op overeenkomstige wijze bewaard tot minstens 6 maanden na accorderen van de proefuitkomsten.

7. Registratie

Formulieren, documenten en analyseresultaten worden per proefserie verzameld en opgeslagen en tenminste 5 jaar bewaard onder verantwoordelijkheid van de betreffende onderzoeker. De uitkomsten worden in een databank opgeslagen.

8. Referenties en overige geraadpleegde literatuur

CVB, 1991. Naar een nieuw eiwitwaarderingssysteem voor herkauwers: het DVE-systeem. *CVB-rapport nr. 7, Lelystad*.

Handleiding Voederwaardeberekening Ruwvoerders. Herziene uitgave, september 2002. *Centraal*

Veevoederbureau, Lelystad.

DeB. Hovell, F.D., Measurement of roughage or protein degradation using the polyester bag 'in sacco' technique. Toelichting bij een computerprogramma. *Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK*.

Dulphy, J.P., C. Demarquilly, R. Baumont, M. Jailler, L. L'Hotelier and C. Dragomir, 1999. Study of modes of preparation of fresh and conserved forage samples for measurement of their dry matter and nitrogen degradations in the rumen. *Ann. Zootechn.* 48, 275-288.

Feil, P.E., P.J. Lenaers en G. Hof, 1995. Het effect van het aantal zakjes per incubatie op de ds-afname. *Ad hoc werkgroep "in sacco" (niet gepubliceerd)*.

Hindle V. A., 1994. A guide to nylon bag experiments with cattle as performed at IVVO-DLO. *Intern Rapport nr. 386 IVVO-DLO*.

Hof G. en S. Tamminga, 1994. Procedures bij in-sacco incubaties en evaluatie van de uitkomsten. *Verslag van een projectgroep*.

Jonge, L.H. de, M. Gierus, P.G. van Wikselaar, V.A. Hindle, A. Klop, A.A. Kamman, G.A.L. Meijer and A.M. van Vuuren, 2002. Characterisation and in vitro degradation of S-fraction proteins in corn gluten feed (dried and ensiled), Lupine meal, soybean meal, and wet brewers' grains silage. *Draft Report ID TNO Animal Nutrition, Lelystad*

Koelen C.J.van der, P.W. Goedhart, A.M.van Vuuren and G. Savoini, 1992. Sources of variation of the in situ nylon bag technique. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 38: 35-42.

Kohn, R.A. and M.S. Allen, 1995. Prediction of protein degradation of forages from solubility fractions. *J. Dairy Sci.* 78: 1774-1788.

Laboratory Manual: Nylon bag, degradability in the rumen. 1996 *Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Foulum; Tjele, Denmark*.

Michalet-Doreau, B., R. Vérité et P. Chapoutot, 1987. Méthodologie de mesure de la dégradabilité in sacco de l'azote des aliments dans le rumen. *Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix, I.N.R.A.* 69: 5-7

Melin, M., M. Gierus, G.A.L. Meijer and A.M. van Vuuren, 2000. Chemical characteristics of the S-fraction of feedstuffs in vitro. *Draft Report; ID TNO Animal Nutrition, Lelystad*

Productschap voor Veevoeder, 1992. Protocol voor de analyse van niet-zetmeel koolhydraten (nsp). (Eds. A.H. van Gelder, E.M. te Brinke, J.W. Cone, H.J. van Lonkhuijzen, J.M. Jetten en W.J. Lichtendonk), 1992. *Kwaliteitsreeks nr. 19 Productschap voor Veevoeder, Den Haag*.

Shannon, S., K.-H. Südekum and A. Susenbeth, 2000. Estimating ruminal crude protein degradation with in situ and chemical fractionation procedures. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85: 195-214 en:

Corrigendum, 2000. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86: 269.

Veevoedertabel 2002. *Centraal Veevoederbureau, Lelystad*.

BIJLAGEN

Bijlage 1: Resultaten van een ringtest betreffende de variatie in de uitwasbaarheid van droge stof bij gebruik van verschillende soorten nylon gaas (ad hoc werkgroep "in sacco", november 1999; niet gepubliceerd).

In deze test had laboratorium C bij de bepaling van de uitwasbaarheid van droge stof van tarwe onverklaarbare sterk afwijkende waarden, die hier niet vermeld worden. Laboratorium B bepaalde alleen de uitwasbaarheid van droge stof van tarwe en niet van sojaschroot. De uitwasbaarheid werd in 4-voud bepaald.

Tabel. De variatie in uitwasbaarheid van droge stof van tarwe en sojaschroot tengevolge van het type gaas. (Procent verdwenen droge stof)

Laboratorium	Product: tarwe			
	Type gaas			
A	PA37/24	PA38/22	PA40/30	PA41/31
	52,04	49,76	48,83	51,50
	51,16	50,13	49,99	51,60
	50,34	49,64	49,23	50,85
	51,01	51,50	48,27	51,63
Gemiddeld	51,14 ± 0,70	50,26 ± 0,86	49,08 ± 0,72	51,39 ± 0,37
B	60,78	60,69	59,57	60,63
	60,50	60,94	60,59	61,31
	60,84	61,47	60,32	59,00
	60,56	61,24	59,01	61,26
Gemiddeld	60,67 ± 0,17	61,09 ± 0,34	59,87 ± 0,72	60,55 ± 1,08
D	47,62	53,89	54,33	55,07
	46,50	52,61	52,28	54,85
	46,55	50,72	53,08	53,55
	46,82	53,08	52,87	52,92
Gemiddelde	46,87 ± 0,52	52,57 ± 1,35	53,14 ± 0,86	54,10 ± 1,03
Totaal gemiddelde	52,89 ± 6,04	54,64 ± 4,93	54,03 ± 4,70	55,35 ± 4,09
	Product: Sojaschroot			
	PA37/24	PA38/22	PA40/30	PA41/31
A	28,29	28,07	28,56	28,78
	28,27	28,24	28,51	28,77
	28,40	28,45	28,37	28,20
	28,64	28,63	28,33	28,44
Gemiddeld	28,40 ± 0,17	28,35 ± 0,24	28,44 ± 0,11	28,55 ± 0,28
C	26,22	26,41	26,75	26,66
	26,86	26,25	28,47	29,94
	27,99	27,20	28,51	26,94
	27,25	26,92	28,21	26,54
Gemiddeld	27,08 ± 0,74	26,70 ± 0,44	27,99 ± 0,83	27,50 ± 1,63
D	29,54	29,15	29,15	29,63
	29,42	29,23	29,23	29,45
	29,42	29,18	29,27	28,98
	28,78	29,51	29,20	29,27
Gemiddelde	29,29 ± 0,34	29,27 ± 0,16	29,21 ± 0,05	29,33 ± 0,27
Totaal gemiddelde	28,25 ± 1,04	27,85 ± 1,20	28,54 ± 0,69	28,47 ± 1,17

Bijlage 2: Toelichting bij enkele paragrafen uit het protocol

Par. 3.2

Indien zakjes meer dan één keer worden gebruikt moeten ze vóór het eerste gebruik een keer met zeep in een wasmachine gewassen worden. Na het gebruik worden ze dan met hetzelfde wasprogramma schoongewassen.

Par. 3.6

Het protocol schrijft geen merk en/of type wasautomaat voor, omdat er regelmatig nieuwe typen op de markt verschijnen en andere niet meer verkrijgbaar zijn. Essentieel is dat er niet gecentrifugeerd wordt, maar dat het water na elke spoeling zo snel mogelijk wordt afgepompt. De goedkoopste wasautomaat die men zou kunnen aanschaffen is er een zonder ingebouwde centrifuge. Het gebruik van een referentiemateriaal in de wasprocedure biedt de mogelijkheid om grote afwijkingen in de prestatie van de wasautomaat op te merken. Het plaatsen van een watermeter kan behulpzaam zijn om een grote verandering in de watertoevoer in vergelijking met de gemiddelde situatie als eventuele oorzaak te identificeren.

Par. 4.4

Zolang nog geen gegevens over de afbreekbaarheid van zetmeel gemeten volgens dit protocol bekend zijn, gelden de waarden voor onbestendig zetmeel zoals vermeld in de Veevoedertabel 2002.

Par. 4.6

1. Bepaalde technologische behandelingen kunnen bedoeld zijn om de afbreekbaarheid van organisch materiaal te verminderen. Het malen van het monster voorafgaand aan de *in situ* incubatie over een 3 mm zeef kan tot gevolg hebben dat het effect van de behandeling in vergelijking met het onbehandelde materiaal niet meer of onvoldoende zichtbaar gemaakt wordt. In dat geval kan het monster vóór de inweeg gekneusd worden.
2. Als de deeltjesgrootte van een proefvoer erg heterogeen is (bijvoorbeeld bij snijmaïs) verdient het aanbeveling het materiaal eerst te zeven over een grofmazige (diameter 1 cm) zeef. Het op de zeef achtergebleven materiaal wordt daarna met een papiersnijder of schaar verkleind tot deeltjes met een maximale lengte van 10 mm. Daarna wordt het verkleinde materiaal zorgvuldig verzameld en homogeen opgemengd met het materiaal dat het zeef gepasseerd is.

Par. 4.7

1. Bij snel fermenteerbare voeders zullen meer relatief korte incubatietijden in aanmerking komen, bijvoorbeeld een aantal tussen 1 en 8 uur; bij traag fermenteerbare voeders zullen incubatietijden worden gekozen vanaf bijvoorbeeld 6 uur. Bij voorkeur moeten enkele waarnemingen gedaan worden rond het punt waar het steile deel van de afbraakcurve overgaat in het asymptotische deel. De afbraak van ruw eiwit en zeker van zetmeel zal al veel eerder dan na 336 uur volledig zijn. Als de afbraak van NDF niet bepaald wordt kan daarom de langste incubatietijd veel korter zijn. Voor eiwit wordt 240 uur aanbevolen. Voor het meten van de afbreekbaarheid van RE, zetmeel en NDF zullen dus vaak verschillende incubatietijdstippen moeten worden aangehouden. Als de darmverteerbaarheid van in de pens niet gefermenteerd materiaal moet worden bepaald, wordt daarvoor een residu genomen van proefvoer dat 12 tot 16 uur in de pens is geïncubeerd.
2. Uit onderzoek blijkt dat het effect van het aantal zakjes dat gelijktijdig geïncubeerd wordt op het droge stof residu afhangt van de duur van de incubatie en het soort voedermiddel (Feil e.a., 1995). Een maximaal aantal van 35 lijkt verantwoord. Het effect van een minimaal aantal zakjes is niet onderzocht.

3. Door de zakjes met inhoud eerst in te vriezen alvorens ze te wassen kunnen de aanhechtende micro-organismen makkelijker verwijderd worden. Volledige verwijdering van micro-organismen is niet mogelijk. Hierop gerichte behandelingen van de incubatieresiduen leiden weliswaar tot een grotere verwijdering van de micro-organismen, maar hebben tevens een zekere verdwijning van onafgebroken voercomponenten tot gevolg.

4. Een meer dan toelaatbare afwijking van de gemiddelde W-waarde van het droge stof-verlies na uitwassen van zakjes met het niet in de pens geïncubeerd referentiemonster kan wijzen op een niet goed functionerende wasautomaat. Deze constatering kan beter niet gedaan worden na spoelen van reeds geïncubeerde zakjes. Het verdient daarom aanbeveling om eerst alle zakjes met proefvoerders en referentiemonster die niet in de pens geïncubeerd zijn uit te wassen en de W-waarden te bepalen. Ook als maar één voedermiddel tegelijk in onderzoek is en alle zakjes tegelijk uitgewassen zouden kunnen worden, verdient het aanbeveling om de zakjes die niet in de pens zijn geïncubeerd apart uit te wassen.

5. Tijdens het droogproces kan in het begin, wanneer het vochtgehalte nog hoog is, enige microbiële groei optreden. Voor de meting van het ruw eiwit- of N-residu heeft dit geen betekenis. Ook wordt aangenomen dat de verbruikte koolhydraatenergie geen significante invloed heeft op de teruggewogen hoeveelheid zetmeel. Maar indien men microbiële besmetting van het residu wil vaststellen of de afbraak van individuele aminozuren wil meten heeft dit wel betekenis. Vriesdrogen is in die gevallen de aangewezen weg.

Par. 4.8

1. In afwijking van normale laboratoriumprocedures wordt hier leidingwater gebruikt omdat ook de uitwasbare fractie, dat is de som van oplosbaar en niet-oplosbaar maar fijn deeltjesmateriaal (< ca. 40 micron), in de wasautomaat met leidingwater wordt bepaald.

2. Hoewel Kohn en Allen (1995) bij hun onderzoek naar oplosbare N-fracties in ruwvoerders centrifugereren bij 1500 x g, wordt in de praktijk door twee laboratoria in Nederland met de beschikbare centrifuges op het hoogste mogelijke toerental gecentrifugeerd. Dat blijkt overeen te komen met 3500 – 4000 x g. Beide laboratoria melden dat de bovenstaande vloeistof dan niet altijd helder is, waarschijnlijk door colloïdaal oplosbaar eiwit. Soms blijft ook wat materiaal op de vloeistof drijven. Er wordt aangenomen dat dit zeer licht celwandmateriaal is. Er moet voorkomen worden dat dit materiaal in het representatieve monster van de bovenstaande vloeistof terecht komt.

Par. 4.9

Uit statistisch oogpunt is het eigenlijk niet juist om de Dixon Q-test toe te passen aangezien er sprake is van twee variabelen, namelijk de koe en het zakje. Als echter één koe duidelijk afwijkende waarden met betrekking tot de droge stof residuen in twee of drie zakjes na een bepaalde incubatietijd vertoont, zal de Dixon Q-test deze ook niet verwerpen. Hier is dan sprake van een koe-effect.

Par. 4.10

1. In de tabel wordt zo veel mogelijk verwezen naar de meest recente gestandaardiseerde voorschriften afkomstig van het Nederlands Normalisatie-instituut. Deze voorschriften zijn soms alleen in een Engelse versie (en) uitgegeven en zijn dan ISO-normen die door het Nederlands Normalisatie-instituut zijn overgenomen (NEN-ISO). Er zijn ook enkele in het Nederlands (nl) uitgegeven normen. Er wordt van uitgegaan dat laboratoria op basis van deze normvoorschriften eigen SOP's formuleren en gebruiken.

2. Bij producten waarvan de verhouding organische restfractie, RNSP ($RNSP = OS - RE - ZET - NDF - SUI * CF_{Di} - RVET$) tot NDF 0,5 of hoger is en het NDF-gehalte bovendien 100 g of meer per kg product bedraagt, moet NDF in de incubatieresiduen bepaald worden. In andere gevallen kan NDF berekend worden uit:

$NDF = OS - RE - ZET$. Mengvoergrondstoffen waarbij NDF in de incubatieresiduen bepaald moet worden (maar die niet allemaal in rundveevoeders verwerkt zullen worden) zijn onder andere: Citruspulp, gist, grondnotenschroot, johannesbrood, maïsspoeling, maïsvoerschroot, millet, protapec, bietenpulp (ongeacht het suikergehalte), sojabonen, sojaschroot (zowel onbehandeld als met formaldehyde of met ligninesulfonaat behandeld), tarwevoerbloem.

Par. 5.1

1. De berekende F_d is niet altijd gelijk aan $(1 - W - U)$ omdat het berekende intercept niet altijd door de gemeten waarde van 0 uur (W) gaat.
2. Het voortschrijdende gemiddelde van k_d en W van het referentiemonster moet, zo mogelijk over laboratoria, via een centrale databank worden bijgehouden. Aangezien het onderhavige protocol door het CVB is geformuleerd, en het CVB ook opdrachtgever is voor het centraal aanmaken van referentiemonster(s) is het CVB de aangewezen instantie voor het beheren van deze databank. Aangezien een afwijking van de waarde van W van ten hoogste $\pm 2 \times s_d$ wordt geweten aan toevallige omstandigheden, die niets te maken hebben met de direct volgende uitwasprocedure van geïncubeerde zakjes, wordt de waarde van W voor de in onderzoek zijnde voedermiddelen niet gecorrigeerd. Als ook na herhaling van de uitwasprocedure de gemiddelde waarde van W te veel afwijkt moet eerst onderzocht worden of dit toe te schrijven is aan een defect van de wasautomaat of aan een afwijkende watertoevoer.
3. In de nabije toekomst zal het DVE-systeem van 1991 door het CVB worden geactualiseerd. In de verdere toekomst zal het geïntegreerd worden in een nutriëntgericht voederwaarderingssysteem. In de beoogde systemen zullen de fracties uitwasbaar, maar niet-oplosbaar eiwit en zetmeel ook een rol spelen. Als het begrip "bestendigheid" dan nog relevant geacht wordt, zal de formule voor de berekening daarvan wijzigen. Met het oog op toekomstige ontwikkelingen wordt geadviseerd om nu reeds altijd de S-fractie van eiwit en zetmeel te bepalen.