

Verdaulichkeit der organischen Substanz: Vergleich von *In-vivo*- und *In-vitro*-Bestimmungen

Jesse Pacheco A.¹, Audrey Pittet², Silvia Ampuero Kragten¹, Yves Arrigo¹

¹Agroscope, 1725 Posieux, Schweiz, ²Berner Fachhochschule, Hochschule für Agrar-, Forst- und Lebensmittelwissenschaften HAFL, 3052 Zollikofen, Schweiz

Auskünfte: Yves Arrigo, E-Mail: yves.arrigo@agroscope.admin.ch



Das Inkubatorglas, das die Säckchen und Puffersubstanzen enthält, wird unter CO₂-Atmosphäre mit Pansensaft befüllt.

Einleitung

Kenntnisse über die Verdaulichkeit der organischen Substanz (vOS) des Futters sind entscheidende Faktoren, um den Energiebedarf des Wiederkäuers zu berechnen, da die Verdaulichkeit eine hohe Korrelation mit der Bruttoenergie des Futters aufweist. Die Referenz bleibt die scheinbare vOS, die *in vivo* durch Verdaulichkeits-

versuche mit Hammeln bestimmt wird (Chenost 1970; Arrigo *et al.* 2002). Allerdings sind *In-vivo*-Bestimmungen anspruchsvoll und aufwendig. Deshalb wurden *In-vitro*-Methoden entwickelt, damit einfacher und rascher eine grosse Anzahl Bestimmungen gemacht werden kann und zudem keine Tierversuche notwendig sind. Unter den verschiedenen existierenden Labormethoden (mikrobiologisch, enzymatisch oder chemisch, Schubiger 2001) liefern die Methoden, die auf Pansensaft basieren, zweifellos die höchsten Korrelationen mit der *In-vivo*-Methode (Aufrère 1982; Geisert *et al.* 2007).

Um eine hohe Übereinstimmung der *In-vitro*- mit der *In-vivo*-vOS zu gewährleisten, ist es unerlässlich, die Faktoren zu optimieren, die den Verdauungsprozess beeinflussen können. Zu diesen Faktoren zählen insbesondere die Inkubationszeit, die Futtermasse und die für die Methode erforderliche Anzahl an Wiederholungen (Yang 2017). Unsere Studie hat sich unter den *In-vitro*-Methoden auf die von Ankom entwickelte Methode für den Daisy[®]-Inkubator fokussiert (Ankom Invitro 2017). Es wurde eine Probenreihe unterschiedlicher Futtertypen analysiert und die Daten mit den *in vivo* bestimmten Werten verglichen.

Tiere, Material und Methode

Die verwendeten Futterproben (n=275) wurden zwischen 1976 und 2014 gesammelt. Jeweils im Jahr der Sammlung wurde die *In-vivo*-Verdaulichkeit des Futters mit vier adulten Hammeln der Rasse Braunköpfiges Fleischschaf (Typ Oxford) bestimmt. Die Tiere wurden mit 0,380 MJ metabolischen Energie pro kg Lebendgewicht^{0,75} × 1,1 gefüttert. Ein Rohproteingehalt (RP) von 110g/kg Trockensubstanz (TS) wurde durch die Zufuhr von Sojaschrot gewährleistet. Die Hammel wurden 21 Tage vor der achttägigen Bilanzperiode an das Futter gewöhnt.

Rückstellproben aller Futtermittel wurden auf 1 mm gemahlen und in Glasbehältern aufbewahrt. Sie wurden vor Licht geschützt in einem temperierten und trocken-

nen aber nicht klimatisierten Raum gelagert. Ende 2016 wurde die vollständige Sammlung durch Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) mit einem FT-NIR-Spektrometer (NIRFlex N-500 von Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz) analysiert (Ampuero Kragten und Wyss, 2014), um den erhaltenen Zustand der Probe zu untersuchen und mit der ursprünglichen chemischen Zusammensetzung zu vergleichen. Für die Durchführung der *In-vitro*-Methode wurden 20 (von 75) Grünfutterproben, 20 (von 135) Heuproben, 20 (von 25) Grassilageproben und 20 (von 40) Maissilageproben aufgrund ihres RP-Gehalts ausgewählt. Pro Futtermittelgruppe wurden je fünf Proben mit den höchsten beziehungsweise tiefsten RP-Gehalten sowie 10 Proben mit mittleren Gehalten genommen.

Die Bestimmung der vOS *in vitro* erfolgte mit dem Ankom Daisy^{II} Incubator (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA) nach dem Methodenbeschrieb des Herstellers (Ankom Invitro 2017). Vier Inkubationsflaschen wurden bei einer Temperatur von 39 °C kontinuierlich in Drehung versetzt, um zu gewährleisten, dass die Säckchen, die das Futter enthielten, permanent in Pansensaft eingetaucht waren. Jede Flasche wurde mit 25 thermoverschweissten Säckchen (F57; Ankom Technology Corp., Grösse 4,3 cm × 4,8 cm, mittlere Porengrösse 25 µm, Kunstfaser), der Pufferflüssigkeit (pH=6,8, Ankom Invitro, 2017) und dem Pansensaft unter Einspeisung von CO₂-befüllt (Mebirouk-Boudechiche *et al.* 2015). Der Pansensaft wurde von laktierenden Fistelkühen unmittelbar vor der Inbetriebnahme des Inkubators entnommen. Die Fütterung der Kühe war während des gesamten Versuchs gleich. Nach der Inkubation wurden die Säckchen entnommen, gespült, getrocknet und im Inkubationsrückstand die TS und Rohasche (RA) bestimmt (Ankom Invitro 2017).

Vor Beginn der Hauptuntersuchung wurde mit Heu und Grassilage überprüft, inwiefern die eingewogene Futtermasse (0,25 vs. 0,50 g), die Inkubationszeit (6 vs. 48 h) und die Anzahl Pansensaft-Spendertiere (eins vs. zwei Pansensaft-Spendertiere) einen Einfluss auf die vOS habe.

Die vOS wurde mit den nachfolgenden Gleichungen berechnet:

$$vOS_{in\ vivo} (\%) = [(OS_{verzehrt}) / OS_{ausgeschieden}] \times 100$$

$$\text{mit Sojaschrot} = [(OS_{verzehrt} - OS_{ausgeschieden} - VOS_{Sojaschrot}) / (OS_{verzehrt} - OS_{Sojaschrot})] \times 100$$

$$vOS_{in\ vitro} (\%) = [1 - (OS_{nach_{in\ vitro}} / OS_{vor_{in\ vitro}})] \times 100$$

OS: organische Substanz; VOS: verdauliche organische Substanz; RA: Rohasche,
 $OS = \text{Masse}_{\text{Probe_trocken}} - RA_{\text{Probe_trocken}}$ mit $RA_{\text{nach_{in\ vitro}}}$ bestimmt durch Veraschung
 $RA_{\text{vor_{in\ vitro}}}$ bestimmt durch NIRS

Zusammenfassung

Agroscope hat die Verdaulichkeit der organischen Substanz *in vivo* und *in vitro* verglichen. In Grünfutter-, Grassilage-, Heu- und Maissilageproben (n=20 pro Futter) wurde von 1976 bis 2014 die *In-vivo*-Verdaulichkeit der organischen Substanz (vOS) bestimmt. Im Jahr 2017 wurde in diesen Proben auch die vOS *In-vitro* mit einer von Ankom (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA) entwickelten Methode ermittelt. Der Vergleich der beiden Methoden ergab beim Grünfutter ein Bestimmtheitsmass (R²) von 0,660, bei der Grassilage von 0,929 und beim Heu von 0,863. Bei der Maissilage lag das Bestimmtheitsmass bei 0,413. Das Bestimmtheitsmass aller Proben beträgt 0,723. Ohne die Proben, die vor 1990 untersucht wurden erhöht sich R² auf 0,730. Die Unterschiede zwischen der *in vitro* und der *in vivo* vOS lagen bei -2,5 bis -3,0 %-Punkten bei Heu, Grünfutter und Maissilage bzw. bei +4,0 %-Punkten bei Grassilage. Die *In-vitro*-Methode bietet eine gute Möglichkeit, die Verdaulichkeit der organischen Substanz von Grünfutter und Raufutterkonserven zu schätzen. Mit dieser Methode können zudem kostengünstig Datenbanken zur Entwicklung von vOS-Schätzmodellen durch Nahinfrarotspektroskopie erstellt werden.

Resultate

Alle Proben der Sammlung wurden im Dezember 2016 mit NIRS analysiert. Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die mit NIRS analysierten Gehalte (Rohprotein: RP, Rohfaser: RF, Lignozellulose: ADF, Zellwände: NDF) gut mit den durch nass-chemische Analysen bestimmten Werten übereinstimmen ($r \geq 0,82$), abgesehen vom RP-Gehalt in Maissilage. Dies lässt vermuten, dass die Grünfütterproben und die Proben der Futterkonserven sich nicht verschlechtert haben und als Referenzen verwendet werden können (Abb. 1). Das durch NIRS bestimmte RP im Mais verändert sich vermutlich im Laufe der Zeit (Abb. 2)

Ergebnisse der *In-vitro*-Vorversuche

Die Inkubationszeit der Säckchen wirkt sich massgeblich auf das Ergebnis aus. Auch die Futtermasse, mit der die Säckchen befüllt werden, spielt eine Rolle. Beide Faktoren beeinflussen die vOS ($n=6$, $p < 0,05$, Abb. 3). Die mit dem Pansensaft zweier Kühe bestimmte vOS unterscheidet sich statistisch nicht von der, die nur mit dem Saft einer einzigen Kuh bestimmt wurde. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse und um eine gute Wiederholbarkeit der Messungen zu gewährleisten, haben wir uns für 0,250g Material pro Säckchen und einer Inkubationszeit von 48 Stunden in einer Pansensaftmischung von zwei Kühen (~1:1) entschieden.

Des Weiteren ergab die Bestimmung der vOS in den 20 Grassilageproben mit dem Pansensaft von drei verschiedenen Spenderkuhpaaren ein r von 0,941, 0,902 und 0,942. Der Mittelwert von 3 drei Wiederholungen ermöglicht eine Reduzierung der Unsicherheit, die durch die für jeden Pansensaft individuelle mikrobielle Zusammensetzung verursacht wird. Der Einfluss des Pansensafts zeigt sich auch in dem in Abbildung 4 ersichtlichen unterschiedlichen Anstieg der drei Wiederholungen. Die Ergebnisse werden anschliessend als Mittelwerte der drei Wiederholungen angegeben.

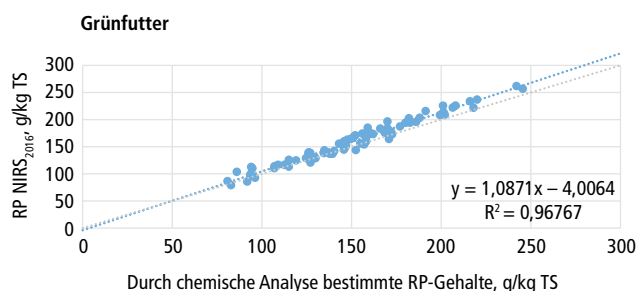


Abb. 1 | Rohproteingehalte von Grünfütter – nass-chemische Analyse vs. NIRS-Analyse im Jahr 2016.

Tab. 1 | Gehalte (nass-chemische Analyse) vs. NIRS-Gehalte und Bestimmtheitsmass der *in-vivo*-vOS-Sammlung von Agroscope in g/kg TS

	n	Gehalt (chem. Analyse) RP	NIRS ₂₀₁₆ RP	R ²	Jahr
Grünfütter	74	151 ± 39	161 ± 42	0,961	1984–2001
Grassilage	24	158 ± 38	154 ± 33	0,939	1991–2002
Heu	135	120 ± 41	121 ± 45	0,931	1986–2004
Maissilage	38	83 ± 4	82 ± 4	0,132	1984–1995

	n	Gehalt (chem. Analyse) RF	NIRS ₂₀₁₆ RF	R ²
Grünfütter	74	239 ± 54	251 ± 46	0,925
Grassilage	24	260 ± 54	245 ± 62	0,984
Heu	135	281 ± 61	281 ± 53	0,935
Maissilage	39	212 ± 43	226 ± 48	0,811

	n	Gehalt (chem. Analyse) ADF	NIRS ₂₀₁₆ ADF	R ²
Grünfütter	74	272 ± 53	290 ± 44	0,885
Grassilage	24	285 ± 64	308 ± 59	0,900
Heu	135	326 ± 66	323 ± 55	0,937
Maissilage	39	243 ± 50	252 ± 54	0,795

	n	Gehalt (chem. Analyse) NDF	NIRS ₂₀₁₆ NDF	R ²
Grünfütter	75	424 ± 98	464 ± 93	0,868
Grassilage	24	411 ± 97	444 ± 101	0,959
Heu	135	509 ± 98	512 ± 95	0,953
Maissilage	39	471 ± 66	459 ± 59	0,670

RP: Rohprotein ; RF: Rohfaser ; ADF: Lignozellulose; NDF: Zellwände
R² Bestimmtheitsmass

vOS-Ergebnisse *in vivo* vs. *in vitro*

Die vier Futtertypen erzielten durchschnittliche *in-vivo*-vOS, die zwischen 67 und 75 % lagen. Die grössten Unterschiede (vOS_{min} zu vOS_{max}) traten bei Heu auf (49,3 % zu 82,7 %), die geringsten beim Grünfütter (65,6 % zu 85,1 %).

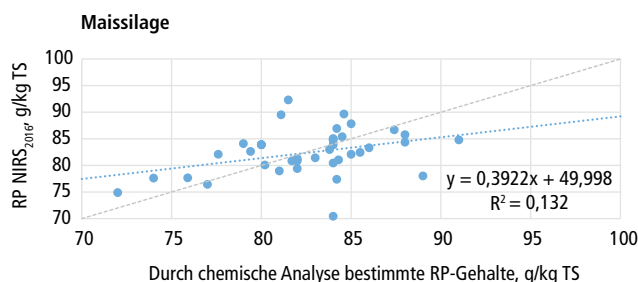


Abb. 2 | Rohproteingehalte von Maissilage – nass-chemische Analyse vs. NIRS-Analyse im Jahr 2016.

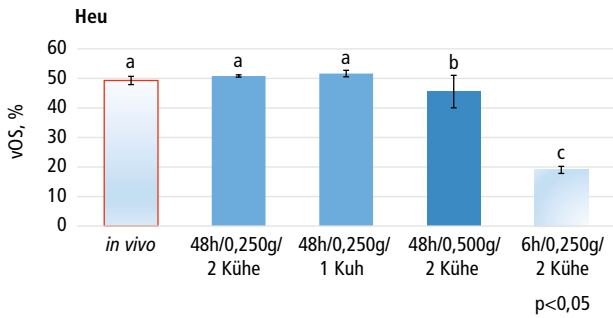


Abb. 3 | *In-vitro*-Verdaulichkeit der organischen Substanz in Abhängigkeit der inkubierten Masse, der Inkubationszeit und der Anzahl an Spenderkühen.

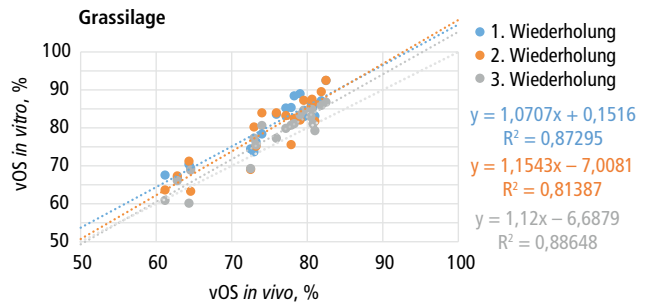


Abb. 4 | Einfluss des Pansensafts auf die *In-vitro*-Verdaulichkeit.

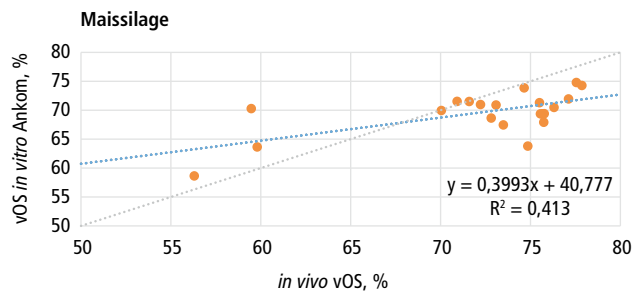
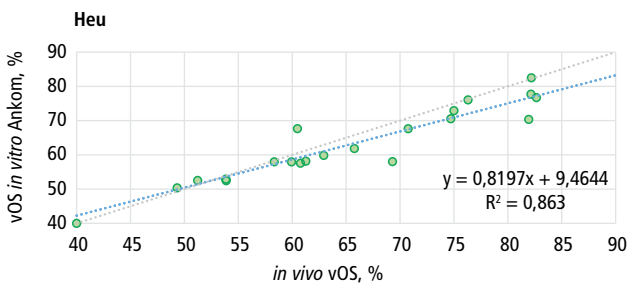
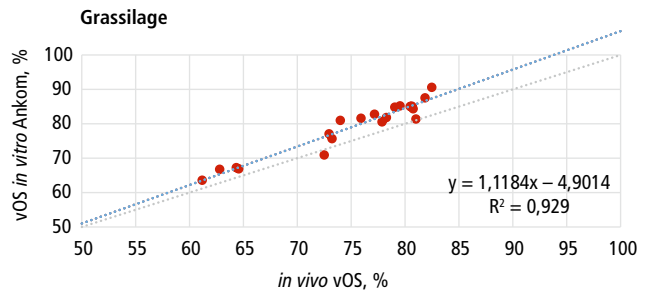
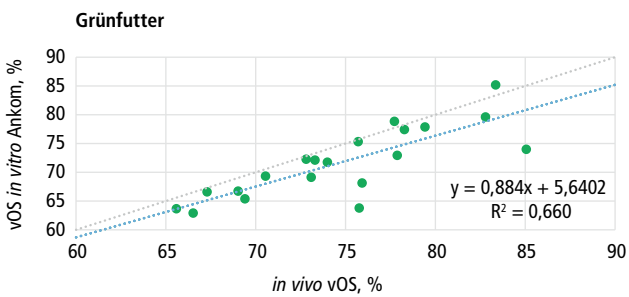


Abb. 5 | Verdaulichkeit der organischen Substanz *in vivo* vs. *in vitro* in %.

Tab. 2 | Verdaulichkeit der organischen Substanz bei durchschnittlich je 20 Proben, die nach 1990 gezogen wurden, in %.

	n	vOS <i>in vivo</i>	vOS <i>in vitro</i>	R ²	n. 1990+	R ²
Grünfutter	20	74,7 ± 5,6	71,7 ± 6,1	0,660	11	0,685
Grassilage	20	75,0 ± 6,8	79,0 ± 7,9	0,929	20	0,929
Heu	20	66,6 ± 11,0	64,1 ± 9,8	0,863	14	0,887
Maissilage	20	72,0 ± 6,2	69,5 ± 3,9	0,413	12	0,194

R²: Bestimmtheitsmass

Die mit der Ankom *In-vitro*-Methode für Grünfütter und Grünfütterkonserven erzielten Werte korrelierten gut mit den *in vivo* vOS (Tab. 2, Abb. 5). Die Ergebnisse dreier Grünfütterproben, Grünroggen, Wiesenschwindel (3. Schnitt) und Standardmischung 108 (2. Schnitt), führten zu einem niedrigeren R^2 für frisches Gras im Vergleich zu konserviertem. Bei Maissilage hingegen lag nur ein Bestimmtheitsmass (R^2) bei 0,413. Mit der *In-vitro*-Methode wird die vOS tendenziell unterschätzt (um 2,5–3,0 %-Punkte). Davon ausgenommen ist die Grassilage (+4,0 %-Punkte). Für alle Futterarten, mit Ausnahme von Proben vor 1990, geht von 0,723 auf einen R^2 von 0,730.

Diskussion

Die Ankom *In-vitro*-Methode lässt sich ziemlich einfach anwenden, die Ausstattung der Inkubationsapparatur erfordert jedoch eine bessere Wärmeisolation, um die Temperatur des Inkubators konstant zu halten. Es ist unerlässlich, ihn 24 h vor Gebrauch einzuschalten, um bei seinem Einsatz eine gleichbleibende Temperatur zu erzielen.

Der Futtertyp beeinflusst die Genauigkeit und die Streuung der Ergebnisse. Bei Grünfütter und Grünfütterkonserven liegt die vOS näher an der vOS *in vivo* als bei Maissilage. Die Tatsache dass die NIRS₂₀₁₆-Werte der Maisproben sich bereits von den nass-chemisch analysierten Werten unterschieden, könnte die schwache Übereinstimmung mit den *in vivo* vOS erklären. Diese Proben könnten sich verändert haben, insbesondere sind empfindliche Nährstoffe wie die Stärke dafür verantwortlich. Im Weiteren ist die Homogenität der Maissilageproben heikel, wo die Kolben, Stängel und Blättern unterschiedliche Gehalte aufweisen.

Die generell etwas höheren *in vivo* vOS lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass während des Bilanzversuches die Pansenflora besser an die Ration angepasst war und ihre Stickstoffversorgung durch die zusätzliche Gabe von Sojaschrot gewährleistet war. Bei der *In-vitro*-Methode wird die Futterprobe in Pansen-saft inkubiert, dessen mikrobielle Flora nicht unbedingt an die zu bestimmenden Futterproben adaptiert ist, was zu einer weniger guten Verdauung führen kann. Um vergleichbare Messungen durchführen zu können, ist es unerlässlich, bei den Pansen-saft-Spendertieren eine (zu bestimmende) Standardfütterung einzusetzen. Davon abgesehen können bei einer Porengrösse der Ankom F57 Säckchen von 25 μm nicht alle Mikroorganismen die Säckchen passieren (Ciliaten: 20–150 μm), was ebenfalls ein Faktor für die tieferen vOS sein könnte.

Schlussfolgerungen

- Zur Bestimmung der *In-vitro* vOS mit der Ankom Methode sollten folgende Punkte berücksichtigt werden:
 - die Futtermasse (0,250 g),
 - die Inkubationszeit (48 h),
 - die Verwendung von Pansen-saft, der von zwei Kühen stammte
 - sowie die Durchführung von drei Wiederholungen sind Faktoren, die zu beachten sind.
 - Ebenso ist es wichtig, Pansen-saft von Kühen zu verwenden, die mit einer Standardration gefüttert wurden.
- Für Grünfütter und Grünfütterkonserven konnte eine gute Übereinstimmung zwischen der *in vitro* und *in vivo* vOS festgestellt werden. In unserer Studie konnte die Aussagekraft der Vorhersage für Maissilage nicht bestätigt werden.
- Die *In-vitro*-Methode ermöglicht es, Datenbanken für Grünfütter und Grünfütterkonserven aufzubauen, um vOS-Schätzmodelle für die Nahinfrarotspektroskopie aufzustellen. ■

Riassunto**Digeribilità della sostanza organica determinata *in vivo* e *in vitro* con l'incubatore Ankom Daisy[®]**

Un paragone tra la digeribilità *in vivo* e *in vitro* è stato realizzato su campioni di foraggio verde, insilato d'erba, fieno e insilato di mais (n=20 per foraggio) in cui la digeribilità della sostanza organica (dSO) *in vivo* era stata determinata precedentemente presso Agroscope a Posieux dal 1976 al 2014, la dSO è stata successivamente determinata *in vitro* con un metodo sviluppato da Ankom (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA). Dal confronto tra i due metodi, è risultato un coefficiente di determinazione (R^2) di 0,660 per i foraggi verdi, di 0,929 per gli insilati d'erba, di 0,863 per il fieno e di 0,413 per gli insilati di mais. Il coefficiente di determinazione della totalità dei campioni è di 0.723, mentre, escludendo i campioni raccolti prima del 1990, esso sale a 0.730. Le differenze tra i dSO *in vitro* e *in vivo* si sono attestate tra -2,5 e -3,0 punti percentuali per il fieno, il foraggio verde e l'insilato di mais e a +4,0 punti percentuali per l'insilato d'erba. Il metodo *in vitro* offre un'alternativa valida per valutare la digeribilità della sostanza organica del foraggio verde e delle conserve di foraggio grezzo. Può anche essere utilizzato per creare banche dati a costi ridotti per lo sviluppo di modelli di stima dSO mediante spettroscopia nel vicino infrarosso.

Summary***In vivo* and *in vitro* organic matter digestibility determined with the Ankom Daisy[®] Incubator**

A comparison of organic matter digestibility (OMd) determined *in vivo* and *in vitro* was conducted with samples of grass, grass silage, hay, and maize silage (n=20 per feed) from the Agroscope Posieux collection. The *in vitro* method was carried out with the Ankom «Daisy[®]» Incubator (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA). The coefficients of determination (R^2) were 0.660, 0.929 and 0.863 for grass, grass silage and hay, respectively. For maize silage a R^2 of OMD of 0.413 was obtained. The overall R^2 , excluding the samples before 1990, went from 0.723 to 0.730. Differences between the *in vitro* and *in vivo* OMD ranged from -2.5 to -3.0 %-points for hay, grass and maize silage, and stood at +4.0 %-points for grass silage. The tested *in vitro* method offers good prospects for predicting the organic matter digestibility of fresh and conserved herbage, especially for setting up a database for OMD prediction models by near-infrared spectroscopy.

Key words: digestability, *in vivo*, *in vitro*, organic matter.

Literatur

- Ankom Invitro, 2017. In vitro true digestibility using the DAISY incubator. Zugang: http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf, https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_3_Invitro_D200_D200I.pdf.
- Ampuero Kragten S. & Wyss U., 2014. Les fourrages à la lumière du proche infrarouge. *Recherche Agronomique Suisse* 5 (5), 204–211.
- Arrigo Y., Daccord R., Schubiger F.X., Lehmann J., Jeangros B. & Scehovic J., 2002. Comparaison de méthodes pour estimer la digestibilité de la matière organique des fourrages. *Schriftenreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich*, (23), 83–84.
- Aufrère J., 1982. Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences* 31 (2), 111–130.
- Chenost M., 1970. Utilisation de la technique de digestibilité *in vitro* pour prévoir la valeur alimentaire des fourrages. *Ann Zootech.* 19 (3), 243–253.
- Geisert B. G., Klopfenstein T. J., Adams D. C. & MacDonald J. C., 2007. Comparison of *in vivo* digestibility to *in vitro* digestibility of five forages fed to steers. *Nebraska Beef Cattle Reports* (95), 109–111.
- Mebirouk-Boudechiche L., Abidi S., Cherif M., Bouzouraa I., 2015. Digestibilité *in vitro* et cinétique de fermentation des feuilles de cinq arbustes fourragers du nord-est algérien. *Revue Méd. Vét.* 166, 11–12, 350–359.
- Schubiger F.X., 2001. Valeur nutritive des plantes de prairie. 5: Digestibilité de la matière organique. *Revue suisse d'agriculture* 33 (6), 275–279.
- Yang W.Z., 2017. Factors Affecting Rumen Fermentation Using Batch Culture Technique. *Fermentation Processes*, Dr. Angela Jozala (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/64207. <https://www.intechopen.com/books/fermentation-processes/factors-affecting-rumen-fermentation-using-batch-culture-technique>.