

UTJECAJ STAROSTI BURAZNOG SOKA NA KARAKTERISTIKE IN VITRO TVORBE PLINA

INFLUENCE OF RUMEN FLUID AGEING ON IN-VITRO GAS PRODUCTION CHARACTERISTICS

G. Kiš, D. Grbeša

Izvorni znanstveni članak
UDK: 636.2.3.:636.085.33.34
Primljeno: 12. lipanj 2000.

SAŽETAK

In-vitro tvorba plina suvremena je metoda ispitivanja fermentacijskih karakteristika krmiva koja se razvijala i usavršavala zadnjih desetljeća. Potpuno automatizirana metoda (Cone i sur., 1996.) jeftina je i precizna, te se sve više koristi u laboratorijima Europe. Među ograničavajućim čimbenicima upotrebe in vitro metoda su: potreba za fistuliranom životinjom, dislokacija laboratorija i životinja, te ograničeno vrijeme transporta buražnog soka (BS). U ovom radu pokušalo se utvrditi utjecaj načina i trajanja skladištenja BS na njegovu aktivnost mjerenu karakteristikama fermentacije krmiva. Uzorci krmiva su fermentirani sa: svježim, te 2, 4, 8 i 24 sata čuvanim u inkubatoru na 39° C, odnosno smrznutim na -24° C tijekom 1, 3, 10, 40, 76 dana BS. Utvrđene su značajne razlike krmiva, i različitih vremena čuvanja buražnog soka. BS čuvan do 4 sata i svježiji BS daju slične ($P < 0,05$) fermentacijske karakteristike u in-vitro plinskoj metodi i može se upotrebljavati u analizi hranjivosti krmiva.

Ključne riječi: in-vitro, tvorba plina, aktivnost buražnog soka, fermentacijske karakteristike krmiva

UVOD

In-vivo metode su vrlo komplicirane, skupe i nepogodne za brze rutinske analize i ništa ne govore o visini probavljivosti krmiva u pojedinim dijelovima probavila. Za krmiva preživača izuzetno je važno znati kolika je njihova probava u predželucima kao glavnom mjestu mikrobiološke razgradnje hrane. Mikroorganizmi buraga kao hranidbeni supstrat koriste razgradljivu ili fermentirajuću organsku tvar krmiva. Među brojnim in-sacco i in-vitro metodama ispitivanja fermentacije krme u buragu preživača metoda automatskog mjerenja proizvodnje plina daje podatke o dinamici i frakcijama razgradnje krmiva.

Od kasnih 1970-ih sve se više proširuje upotreba in-vitro tvorbe plina u utvrđivanju svojstava probavljivosti i dinamike fermentacije krmiva za preživače (Theodorou i sur., 1994., 1998.). Koristi se klasična plinska metoda (Menke i sur., 1979.), i njene modifikacije koje su automatizirane i koriste razne, elektroničke mjerače tlaka i računala u cilju povećanja brzine i točnosti analiza (Buevnik i sur., 1992., Pell i Schofield,

Dipl. ing. Goran Kiš, Doc. dr. sc. Darko Grbeša, Zavod za hranidbu domaćih životinja Agronomskog fakulteta Zagreb, Svetošimunska 25, Hrvatska - Croatia.

1993., Cone i sur., 1994., Getachew i sur., 1998., Davies i sur., 2000.).

In-vivo metoda tvorbe plina (Cone i sur., 1997.) pokazala se kao jeftina i precizna metoda za određivanje razlika u dinamici fermentacije krmiva u buragu (Cone, 1998.).

Utjecaj BS na dinamiku fermentacije ispitivana je potpuno automatizirano aparaturom tvorbe plina (Cone i sur., 1996.). Oblik krivulje tvorbe plina uvjetovana je kemijskim sastavom supstrata, obrokom životinja donora, adaptaciji životinje na obrok, vremenu uzimanja buražnog soka te koncentracijom supstrata (Cone i sur., 1996.).

U uvjetima dislokacije laboratorija za ispitivanje plinskom metodom i životinja, donora BS-a veliku pomoć predstavlja znanje o vremenu u kojem ga se može koristiti bez promjena njegove aktivnosti, a time i fermentacijskih karakteristika krmiva mjerenih in-vitro tvorbom.

MATERIJAL I METODE RADA

Analizirana su tri krmiva, različita po sastavu u svojim fermentabilnim svojstvima, rezanci šećerne repe, tapioka i trava (većinom engleski ljulj). Uzorci su sušeni u sušioniku na 70° C i mljeveni u mlinu čekićaru na veličinu čestica od 1mm.

BS uziman je 2 sata nakon jutarnjeg obroka iz dva fistulirana Texel ovna držana na standardnom obroku od 800 g sijena i 200 g koncentrata niskog sadržaja škroba. U svrhu ovog pokusa BS je razrijeđen u omjeru 32,25% (v/v), držan u vodenoj kupelji na 39° C sa stalnim propuhivanjem CO₂ kroz 24 sata. Drugi dio BS-a stavljan je u boce, prethodno punjene s CO₂, te nefiltriran smrzan i pohranjen na -24° C.

Inkubacija je dalje vršena prema metodi opisanoj po Cone i sur., 1996. Svaki uzorak ponovljen je najmanje 2 puta u duplikatu u dvije različite serije.

Određivanje tvorbe plina vršeno je potpuno automatskim sustavom opisanim po Cone i sur., 1996.

Utjecaj starosti BS-a na njegovu aktivnost ispitivan je upotrebom svježeg, te 2, 4, 8 i 24 sata u inkubatoru čuvanog BS-a prije fermentacije kao i smrznutog 1, 3, 10, 40, 76 dana.

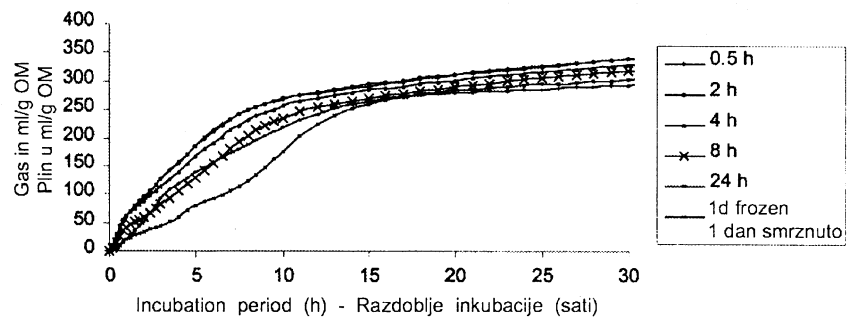
Dobiveni podaci obrađeni su tri-faznim modelom (Cone i sur., 1996. i Groot i sur., 1996), dok je statistička analiza podataka rađena upotrebom statističkog paketa SAS, 1990.

REZULTATI I DISKUSIJA

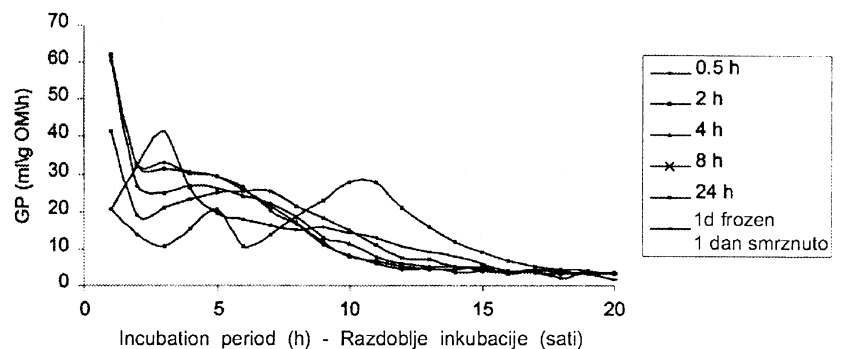
Ruminalni sok bez smrzavanja

Držanje BS-a četiri sata pod opisanim uvjetima i nakon toga inkubiranih s repinim rezancima, po opisanoj metodici, svojstvima tvorbe plina ne daje značajne promjene. Svojstva tvorbe nisu promijenjena značajno ($P>0.05$), ali se određeni trendovi uočavaju (Slike 1 i 2).

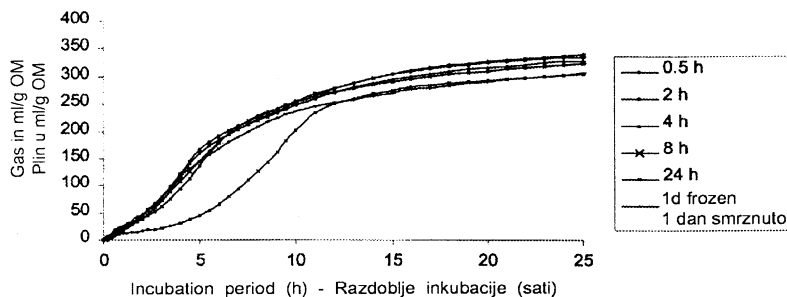
Slika 1. Ukupna tvorba plina: rezanci šećerne repe
Figure 1. Cumulative gas production profile: beet pulp



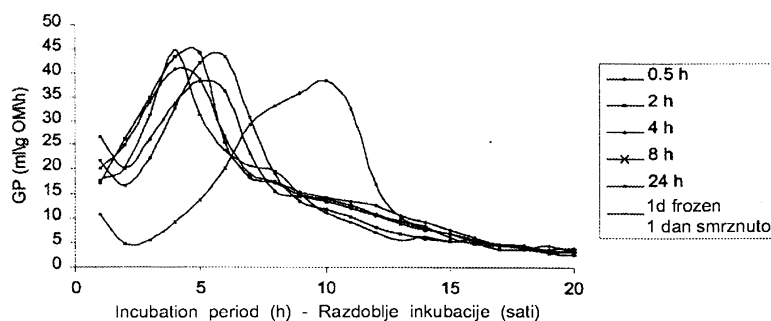
Slika 2. Prva derivacija od slike 1.: rezanci šećerne repe
Figure 2. First derivative of Figure 1: beet pulp



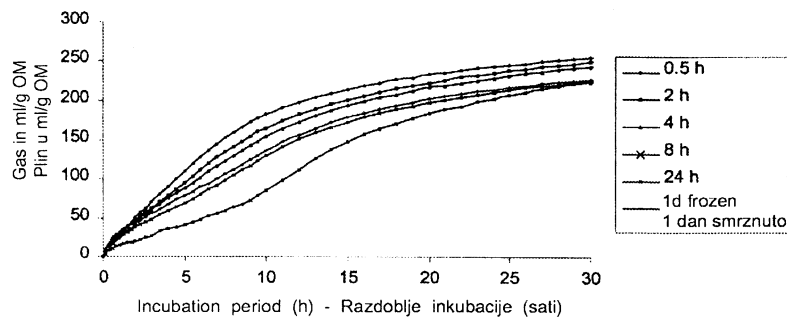
Slika 3. Ukupna tvorba plina: tapioka
Figure 3. Cumulative gas production profile: cassava



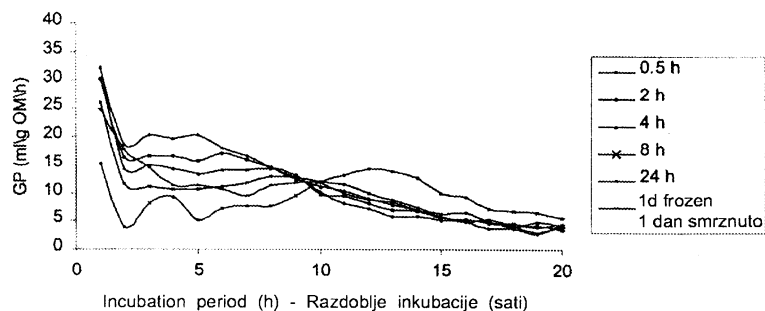
Slika 4. Prva derivacija od slike 3.: tapioka
Figure 4. First derivative of Figure 3: cassava



Slika 5. Ukupna tvorba plina: trava
Figure 5. Cumulative gas production profile: grass



Slika 6. Prva derivacija od slike 5: trava
Figure 6. First derivative of Figure 5: grass



S dužim vremenom čuvanja BS-a smanjuje se ukupna količina tvorbe plina i količine plina u prvom razdoblju topivi dio repinih rezanaca. Isto tako produljuje se vrijeme pojedinog razdoblja potrebnog za tvorbu polovine količine plina.

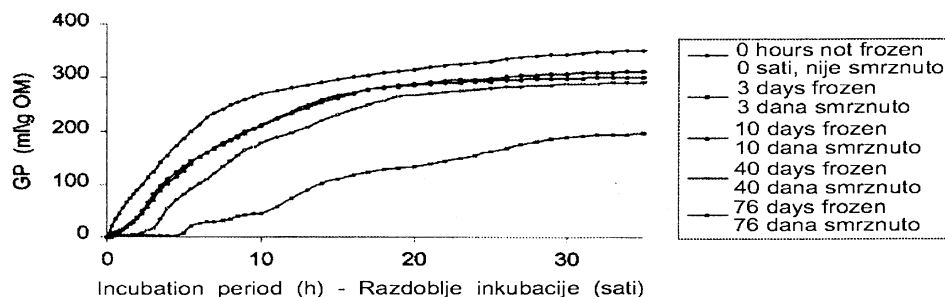
Nadalje, povisuje se količina plina u drugom razdoblju – netopivi dio krmiva. Očito je da sadržaj topiva i netopiva razdoblja ovisi o BS-u, a ne samo o vrsti krmiva. Slika 2 pokazuje da se najveći dio plina topivog dijela uzorka proizvodi za vrijeme prva dva sata inkubacije, a kasniju tvorbu je vrlo teško prikazati grafički jer se ne razlučuje topivi od netopivog dijela krmiva. Starenjem BS-a početna tvorba plina nastala fermentacijom topivog dijela krmiva se smanjuje, ali se može stvoriti pogrešan privid povećanja zbog preklapanja tvorbe plina iz topive i netopive frakcije krmiva.

In-vitro tvorba plina i utjecaj starosti čuvanja BS-a na inkubaciju tapioke pokazuju slike 3 i 4.

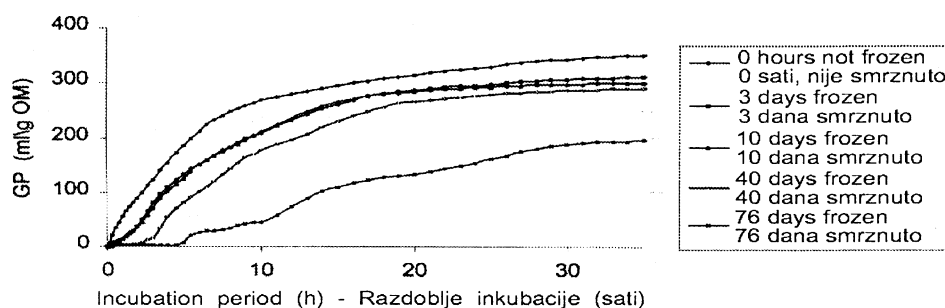
Karakteristike fermentacije uzorka s BS-om starim osam sati ne razlikuju ($P > 0,05$) se od svježeg. Značajna razlika ($P < 0,05$) i u svojstvima fermentacije, ukupna količina plina i vrijeme fermentacije pojedinih frakcija uzorka, tapioke značajni su za BS čuvan 24 sata.

Fermentacija trave i različito vrijeme čuvanja BS-a daje istovjetne rezultate kao one koji su dobiveni fermentacijom tapioke, ali ovdje postoji značajna razlika ($P < 0,05$) između vremena polovice tvorbe plina topivog dijela koji nije stariji od dva sata i starijeg BS-a. Značajna razlika postoji i u ukupnoj tvorbi plina i vremenu polovice tvorbe plina razgrađivog razdoblja između svježeg i jedan dan smrznutog BS-a. Svojstva fermentacije trave prikazana su na slikama 5 i 6.

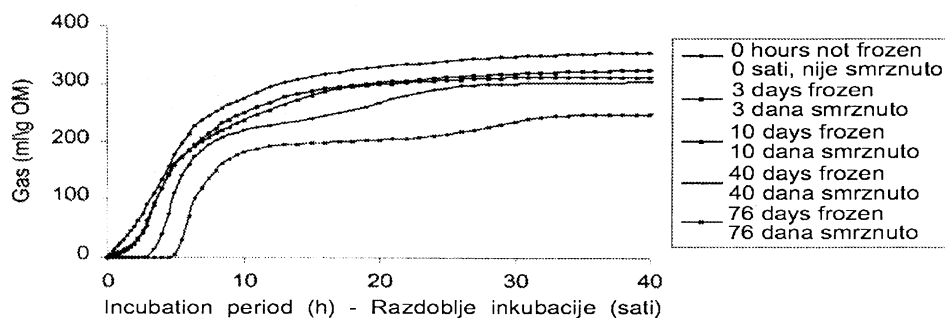
Slika 7. Ukupna tvorba plina: rezanci šećerne repe
Figure 7. Cumulative gas production profile: beet pulp



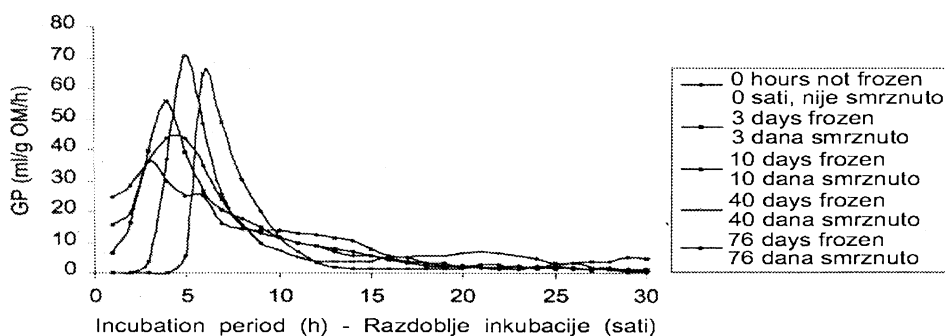
Slika 8. Prva derivacija od slike 7: rezanci šećerne repe
Figure 8. First derivative of Figure 7: beet pulp



Slika 9. Ukupna tvorba plina: tapioka
Figure 9. Cumulative gas production profile: cassava



Slika 10. Prva derivacija od slike 9: tapioka
Figure 10. First derivative of Figure 9: cassava



Smrznuti ruminalni sok

Aktivnost smrznutog BS-a ispitivana je u drugom dijelu ovog pokusa. Slike 7 i 8 prikazuju kumulativnu tvorbu plina i njegovu prvu derivaciju s supstratom; rezanci šećerne repe.

Ustanovljeno je da je s tri-faznim modelom crtanja krivulja fermentacije smrznutim BS-om to vrlo teško. Vrijednosti fermentacije koje su dobivene bile su vrlo niske naročito topivog dijela. Sve vrijednosti pokazivale su izrazite nelogičnosti i jedino je vrijednost polovice vremena tvorbe plina netopivog dijela (najvažniji pokazatelj dinamike razgradnje) pokazivala logičan trend i mogućnost uspoređivanja. Rezultati dobiveni fermentacijom repinih rezanaca pokazuju pad ukupne tvorbe plina i povećanje vremena potrebnog za tvorbu plina netopivog dijela.

Fermentacija tapioke različita je od fermentacije repinih rezanaca. Nema razlike u vrijednosti vremena potrebnog pa polovicu tvorbe plina netopivog dijela uzorka između svježeg i smrznutog BS-a. Svojstva fermentacije pokazuju slike 9 i 10.

Vrijednosti prve derivacije pokazuju da duže smrznuti BS ima dulje vrijeme aktivacije, no nakon toga fermentacija kreće veoma naglo. Uz ovakvu dinamiku fermentacije vrlo je teško analizirati tri-faznim modelom i uspoređivati frakcije uzorka svježeg i smrznutog BS-a. Ovakva fermentacija povećava fermentaciju treće frakcije, što je, vjerojatno, rezultat selektivnog rasta mikroorganizama.

Fermentacija trave kao supstrata u fermentaciji pokazuje slična svojstva kao ona dobivena fermentacijom repinih rezanaca (Slika 11. i 12.).

ZAKLJUČAK

Utjecaj starosti BS-a na njegovu biološku aktivnost mjenen je tvorbom plina tri različita krmiva fermentacijskim svojstvima.

Aktivnost smrznutog BS-a pokazala se neočekivano visoka, te se kasnije pristupilo ispitivanju sa smrznutim.

S repinim rezancima smrznuti BS pokazuje manju ukupnu tvorbu plina i za fermentaciju pojedinih frakcija supstrata treba više vremena. S travom, također, uočavana je značajna razlika ($P < 0,05$) pri fermentacijama svježeg i smrznutog BS-a. Jedino kod fermentacije tapioke nema značajne razlike između svježeg i 24h smrznutog BS-A.

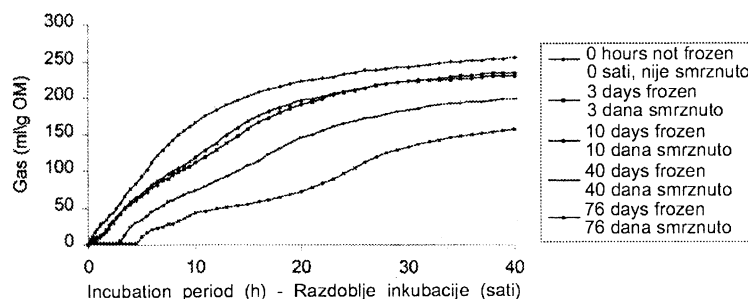
Na temelju postignutih rezultata može se zaključiti da ne opada biološka aktivnost BS-a čuvanjem do 4 sata te se može koristiti u in-vitro plinskoj metodi. Duže čuvanje ili smrzavanje BS-a nije poželjno ili se ne može prakticirati za sva krmiva jer dovodi do krivih rezultata i pogrešnih zaključaka o fermentacijskim svojstvima analiziranih krmiva.

LITERATURA

1. Buevnik, J. M. W., S. F. Spoelstra, R. J. Hogendrop (1992): An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. *Neth. J. Agric. Sci.* 40, 401-407.

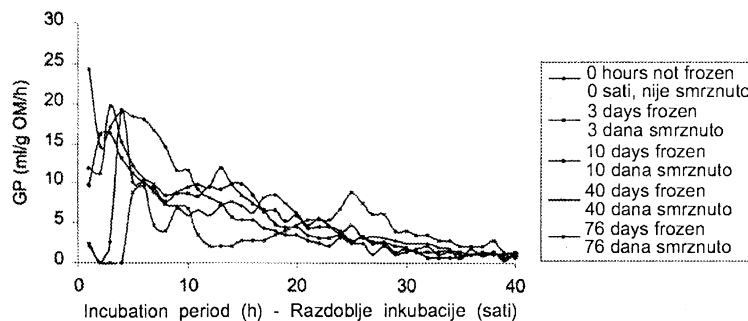
Slika 11. Ukupna tvorba plina: trava

Figure 11. Cumulative gas production profile: grass



Slika 12. Prva derivacija od slike 11: trava

Figure 12. First derivative of Figure 11: grass



2. Cone, J. W., J. M. W. Boevnik, M. A. M. Rodrigues (1994): Use and applications of time related gas production test for the in vitro study of fermentation kinetics in the rumen. *Rev. Port. Zootec.* 1, 25-37.
3. Cone, J. W., A. H. Van Gelder, G. J. W. Visscher, L. Oudshoorn (1996): Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61, 113-128.
4. Cone, J. W., A. H. Van Gelder, F. Dreihuis (1997): Description of gas production profile with a three-phasic model. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 31-45.
5. Cone, J. W., A. H. Van Gelder, H. Valk (1998): Prediction of nylon bag degradation characteristic of grass samples with the gas production technique. *J. Sci. Food Agric.* 77, 421-426.
6. Davies, Z. S., D. Mason, A. E. Brooks, G. W. Griffith, R. J. Merry, M. K. Theodorou (2000): An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83, 205-221.
7. Getachew, G., M. Blummel, H. P. S. Makkar, K. Becker (1998): In vitro gas measuring techniques for

- assessment of nutrition quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72, 261-281.
8. Groot, J. C. J., J. W. Cone, B. A. Williams, F. Debersaque, E. A. Lantinga (1996): Multiphasic analysis of gas production kinetic on in vitro ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 77-89.
 9. Menke K., L. Raab, A. Selewski, H. Steingass, D. Fritz, W. Schneider (1979): The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci. Camb.* 93, 217-222.
 10. Peel, A. N., P. Schofield (1993): Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* 76, 1063-1073.
 11. SAS, (1990): SASa, Procedures Guide, Version 6, Third Edition, SAS Institute Inc. Cary. NC.
 12. Theodoru, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, J. France (1994): A new gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197.
 13. Theodoru, M. K., R. S Lowman, Z. S. Davies, D. Cuddeford, E. Owen (1998): Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. In: Deavile, E.R., Owen, E., Adesogan, A.T., Rymer, C., Huntington, J.A., Lawrence, T.L.J. (Eds.), *In vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*. Occasional publication, No. 22 British Society of Animal Science, pp. 55-63

SUMMARY

In-vitro gas production is a modern method for examining fermentation characteristics of feeds, which has been developing and improving in the last decades. A fully automated method (Cone et al., 1996) it is cheap and accurate and is increasingly used in the laboratories in Europe. Among the limiting factors of the use of in-vitro method are: the need for a fistulated animal, dislocation of laboratories and animals and the limited time for the transport of the rumen fluid (RF). This study was an attempt to establish the influence of the way and duration of RF storage on its activity measured by the feed fermentation characteristics. Samples of feed were fermented with fresh RF kept, 2, 4, 8, and 24 hours in the incubator at 39°C, or frozen at -24°C during 1, 3, 10, 40 and 76 days. Significant differences among various feeds and the time of keeping the rumen fluid were established. RF kept up to 4 hours and fresh RF give similar ($P < 0.05$) fermentation characteristics in in-vitro gas method and can be used in analyzing feed nutrition.

Key words: in-vitro, gas production, rumen fluid activity, fermentation feed characteristics