

PROCJENA *AD LIBITUM* KONZUMACIJE I *IN VIVO* PROBAVLJIVOSTI VOLUMINOZNE KRME NIR SPEKTROSKOPIJOM

PREDICTION OF FORAGE *AD LIBITUM* INTAKE AND *IN VIVO* DIGESTIBILITY BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPY

Marina Vranić, K. Bošnjak, S. Glavanović, Nataša Puček Pintić, Andreja Babić, I. Vranić

Pregledni znanstveni članak - Review scientific paper
Primljeno - Received: 14. siječanj - Januar 2020

SAŽETAK

Cilj ovog rada je prikazati stanje spektroskopije u bliskom infracrvenom području (NIR spektroskopije) kao tehnologije za procjenu *ad libitum* konzumacije suhe tvari (ST) i organske tvari (OT) te *in vivo* probavljivosti ST, OT i OT u ST (D-vrijednosti) voluminozne krme.

U usporedbi s provedbom skupih, radno zahtjevnih i dugotrajnih bioloških istraživanja radi utvrđivanja *ad libitum* konzumacije i *in vivo* probavljivosti voluminozne krme, NIR spektroskopija je brza, fizikalna, nedestruktivna, multianaliitička i ekološki prihvatljiva metoda koja može dati precizne i točne rezultate uz minimalnu ili nikakvu pripremu uzoraka. Biološki se parametri teže procjenjuju NIR spektroskopijom u odnosu na kemijske parametre voluminozne krme radi varijacija između životinja, a posljedično pogrešaka u procjeni reakcija životinja na određenu hranidbu i hranu te činjenice da se niti jedan biološki parametar ne može utvrditi u kemijskom laboratoriju s visokom razinom točnosti.

Prikazani kalibracijski modeli su prihvatljive razine pouzdanosti procjene *ad libitum* konzumacije i *in vivo* probavljivosti voluminozne krme prema utvrđenim koeficijentima determinacije (R^2) (0,7-0,9 i 0,47-0,98 slijedom), standardnim greškama kalibracije (SEC) (4,28-6,89 i 0,01-1,69 slijedom), standardnim greškama unakrsne validacije (SECV) (4,53-7,92 i 0,02-2,15 slijedom) te standardnim greškama procjene (SEP) (5,42-9,59 i 0,026-5,7 slijedom).

Ovo istraživanje potvrđuje potencijal NIR spektroskopije za procjenu *ad libitum* konzumacije ST i OT voluminozne krme i *in vivo* probavljivosti ST, OT i D-vrijednosti voluminozne krme.

Ključne riječi: voluminozna krma, *ad libitum* konzumacija, *in vivo* probavljivost, NIR spektroskopija

UVOD

Voluminozna krma je varijabilne hranidbene vrijednosti (Andueza i sur., 2016.) na što utječu brojni čimbenici poput plodnosti i strukture tla, agrotehnologije proizvodnje, vrste, sorte, varijeteta biljnog

materijala, zrelosti usjeva prilikom košnje (rok košnje), tehnologije konzerviranja i skladištenja, prisutnih korova i anti-hranidbenih čimbenika, mikroklimatskih čimbenika uzgoja te primijenjene tehnologije skladištenja i hranidbe (Vranić i sur., 2004.; 2005.).

Marina Vranić, Krešimir Bošnjak, e-mail: kbosnjak@agr.hr; Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za specijalnu proizvodnju bilja, pokušalište Centar za travnjaštvo, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb; Siniša Glavanović, Belupo Inc., Istraživanje i razvoj, Danica 5, 48000 Koprivnica, Nataša Puček Pintić, Andreja Babić, Ivica Vranić, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Poljana Križevačka 185, 48260 Križevci

Biološki parametri hranidbene vrijednosti voluminozne krme obuhvaćaju *ad libitum* konzumaciju suhe tvari (ST) i organske tvari (OT) krme, probavljivost ST, OT te probavljivost OT u ST (D-vrijednost) itd., a utvrđuju se provedbom bioloških istraživanja korištenjem životinja. Biološka istraživanja su dugotrajna, radno zahtjevna, potrebne su velike količine hrane i korištenje životinja te su stoga nepraktična i skupa za rutinsko korištenje (Omed, 1986.; Thomas i Campling, 1979.). Tako npr. biološko istraživanje utvrđivanja konzumacije i probavljivosti 4 vrste voluminozne krme (4 hranidbena tretmana) može trajati 84 dana (Vranić i sur., 2008.a, 2013.) uz sve organizacijske i fizičke napore te financijska sredstva potrebna za provedbu takvog istraživanja.

U svrhu procjene hranidbene vrijednosti voluminozne krme, kemometrijska tehnika bliske infracrvene spektroskopije (NIR spektroskopija), počela se primjenjivati 60-ih godina prošlog stoljeća, a od 1976. godine (Norris i sur., 1976.) se koristi kao prihvatljiva metoda nedestruktivne analize (Andreu-Rodríguez i sur., 2017.) i pouzdan alat za procjenu hranidbene vrijednosti voluminozne krme (Ibáñez i Alomar, 2008; Molano i sur., 2016.).

Razina potencijalne konzumacije i probavljivosti krme izravno utječe na proizvodnost životinja (Murry, 1993.). Norris i sur. (1976.) navode da se NIR spektroskopijom može procjenjivati *ad libitum* konzumacija voluminozne krme, ali s nižom razinom pouzdanosti ($R^2 = 0,6$) u usporedbi s procjenom *in vivo* probavljivosti ST krme ($R^2 = 0,8$). Ograničavajući čimbenik razvoja NIR predikcijskih kalibracijskih modela za procjenu *ad libitum* konzumacije voluminozne krme je niz čimbenika koji utječu na konzumaciju krme poput vegetacijske sezone (Hodgson i sur., 1977.), vrste, kategorije i kondicije životinja te trajanja istraživanja (Marry, 1993.). Kod razvoja NIR kalibracija za procjenu *in vivo* probavljivosti voluminozne krme osnovni limitirajući čimbenik je i nedostatak uzoraka za kalibraciju koji su porijeklom iz *in vivo* bioloških istraživanja provedenih pomoću određene vrste životinja s obzirom na vrstu, kategoriju i produkciju, a držanih u kontroliranim uvjetima smještaja i okoline (Marry, 1993.).

Cilj ovog rada je prikazati trenutno stanje spektroskopije u bliskom infracrvenom području (NIR spektroskopije) kao tehnologije za procjenu *ad libitum* konzumacije ST i OT te i *in vivo* probavljivosti ST, OT i D-vrijednosti voluminozne krme.

POUZDANOST NIR KALIBRACIJSKIH MODELA

Kod razvoja kalibracijskog modela korištenjem NIR spektroskopije osnovno je osigurati kalibracijski set uzoraka, priupiti spektralne podatke te, korištenjem neke od kemometrijskih regresijskih metoda, povezati ih u matematički odnos s rezultatima referentnih analiza (Landau i sur., 2006.). Za modeliranje spektralnih rezultata s rezultatima referentnih analiza, za uzorke voluminozne krme, najčešće se primjenjuju neki od metoda poput principal component analysis (PCA), principal component regression (PCR), multi-linear regression (MLR), partial least squares regression (PLS), modified partial least squares regression (MPLS) itd. (Murry, 1993., Fernández, 2015.).

Prema Landau i sur. (2006.), pouzdanost i primjenjivost razvijene kalibracije za NIRS aparat može se utvrditi prema koeficijentu determinacije (R^2), odnosno, jačinom linearne povezanosti koja uključuje stupanj varijabilnosti referentnih podataka obuhvaćenih jednadžbom regresije. Koeficijent R^2 prikazuje visinu pouzdanosti primijenjenog NIR kalibracijskog modela za pojedini parametar, s jedne strane procijenjen NIR spektroskopijom, a s druge korišten za razvoj kalibracije (Sohn i sur. 2006.). Vrijednost R^2 kreće se od 0 do 1, a što je bliža broju 1, to je rezultat pouzdaniji (Sohn i sur. 2006.). Pouzdanost razvijenog NIR kalibracijskog modela se može ocijeniti kako slijedi: (i) $R^2 = 0,3$ do $0,49$, niska razina pouzdanosti procjene; (ii) $R^2 = 0,50$ do $0,69$, gruba procjena; (iii) $R^2 = 0,7$ do $0,9$ prihvatljiva procjena; (iv) više od $0,90$, visoka razina pouzdanosti procjene (Shenk i sur., 2001.; Williams i Sobering, 1996.).

Druge varijable važne za razvoj kalibracija za NIRS aparat su standardna greška kalibracije (SEC) i standardna greška unakrsne validacije (SECV) koje predstavljaju razlike između vrijednosti procijenjenih NIR spektroskopijom i vrijednosti utvrđenih referentnim kemijskim metodama. Predikcijski kapacitet razvijenog kalibracijskog modela ocjenjuje se standardom greškom procjene (SEP) koja ukazuje na preciznost procjene, odnosno razliku procjene između ponovljenih skeniranja (Landau i sur., 2006.). Razvijena kalibracija koja ima visok R^2 i niske vrijednosti SEC, SECV i SEP je primjenjiva (Landau i sur., 2006.). Validacija jednadžbe se provodi uključivanjem spektara uzoraka istog kalibracijskog seta za procjenu kalibriranih parametara u uzorcima nepoznatog kemijskog sastava (Molano i sur., 2016.).

U praksi se kontrola procijenjenog rezultata NIR analize provodi pomoću H statistike (Mahalanobis distance) s ciljem da se smanji ili potpuno isključi greška procjene (Martens i Naes, 2001.).

BIOLOŠKI PARAMETRI HRANIDBENE VRIJEDNOSTI VOLUMINOZNE KRME

Neki od bioloških parametara hranidbene vrijednosti uzoraka voluminozne krme su *ad libitum* konzumacija i *in vivo* probavljivost ST, OT i pojedinih kemijskih parametara krme, D-vrijednost, razgradivost SP u buragu preživača (razgradivi SP), faktor konzumacije za goveda, faktor konzumacije za ovce, a za fermentirane uzorke udio energije iz krme dostupan za mikrobe buraga (Vranić i sur., 2004., 2005.).

PROCJENA AD LIBITUM KONZUMACIJE VOLUMINOZNE KRME NIR SPEKTROSKOPIJOM

Konzumacija voluminozne krme *ad libitum* je u pozitivnoj korelaciji s količinom hranjivih tvari koje životinja dobije hranom i s probavljivošću hrane te izravno utječe na proizvodnost životinja i na ekonomiku proizvodnje (Benvenuti i sur., 2014.). Na konzumaciju voluminozne krme utječe rok košnje biljne mase (Thomas i sur., 1988.) jer voluminozna krma košena u ranijoj fazi fitofenološke zrelosti ima veću konzumaciju u usporedbi s voluminoznom krmom košenom u kasnijoj fazi fitofenološke zrelosti (Vranić i sur., 2008.a).

Na konzumaciju voluminozne krme utječe vrsta voluminozne krme, kemijski sastav i probavljivost na način da se niža konzumacija travne silaže u usporedbi sa svježom travnom masom objašnjava negativnom korelacijom između konzumacije silaže te koncentracije NH₃-N i maslačne kiseline koje nastaju kao rezultat siliranja (Rook i Gill, 1990.). Nadalje, do niže konzumacije silirane u odnosu na svježnu travnu masu dolazi i zbog nižeg pH silaže (McLeod i sur., 1970.), niže koncentracije ugljikohidrata (Henderson i sur., 1984.) te veće koncentracije octene kiseline u fermentiranoj krmi (Demarquilly, 1973.).

Na konzumaciju krme utječe i združeno djelovanje ili asocijativni učinak pojedinih krmiva kao komponenti obroka (Huhtanen, 1998.). Združeni utjecaj krmiva u hranidbi životinja je ovisan o kvaliteti svakog pojedinog krmiva uključenog u obrok (Vranić i sur., 2013.). Npr., proteini travne silaže imaju nižu hranidbenu vrijednost od proteina travne mase jer sadrže puno topivog ili brzo razgradivog proteina, kojeg zbog nedostatka brzo fermentirajuće energije (vodotopljivi šećeri) mikroorganizmi buraga ne mogu iskoristiti za sintezu svojih proteina, pa može ostati neiskorišten za mikroorganizme buraga, a time i za životinju (Siddons i sur., 1990.; Lopez i sur., 1991.). Obroku baziranom na travnoj silaži ili sjenaži treba dodati krmivo ili krmiva bogata energijom (npr. kukuruzna silaža, zrno kukuruza itd.) kako bi se u probavnom traktu optimalno iskoristile hranjive tvari (Vranić i sur., 2008.b).

U tablici 1 nalaze se rezultati procjene *ad libitum* konzumacije voluminozne krme NIR spektroskopijom

Tablica 1. Procjena *ad libitum* konzumacije voluminozne krme NIR spektroskopijom

Table 1 Prediction of *ad libitum* forage intake by NIR spectroscopy

Voluminozna krma / Forage	N	R ²	SEC	SECV	SEP	Autor
Konzumacija ST/DM intake						
Travna silaža / Grass silage	136	0,90	4,59	5,05	5,42	Park i sur. (1998.)
Voluminozna krma / Forage	103	0,80	5,32	5,53	-	Decruyenaere i sur. (2015.)
Voluminozna krma / Forage	100	0,84	6,7	-	-	Kneebone i sur. (2015.)
Trave / Grasses	750	0,63	6,12	6,43	7,77	Andueza i sur. (2011.)
Mahunarke / Legumes	140	0,42	6,89	7,92	9,59	Andueza i sur. (2011.)
Voluminozna krma / Forage	1012	0,80	5,32	5,53	-	Decruyenaere i sur. (2015.)
Konzumacija OT/OM intake						
Voluminozna krma / Forage	936	0,80	4,28	4,53	-	Decruyenaere i sur. (2015.)
Voluminozna krma / Forage	100	0,80	6,8	-	-	Kneebone i sur. (2015.)
Voluminozna krma / Forage	936	0,83	4,28	4,53	-	Decruyenaere i sur. (2015.)

ST, suha tvar; OT, organska tvar; n, broj uzoraka; R², koeficijent determinacije; SEC, standardna greška kalibracije; SECV, standardna greška unakrsne validacije; SEP, standardna greška procjene / DM, dry matter; OM, organic matter; N, number of samples; R², coefficient of determination; SEC, standard error of calibration; SECV, standard error of cross validation; SEP, standard error of prediction.

Ranija istraživanja (tablica 1.) pokazuju mogućnost pouzdane procjene *ad libitum* konzumacije ST i OT voluminozne krme korištenjem NIR spektroskopije (Decruyenaere i sur., 2015.; Kneebone i sur., 2015.). R^2 je za procjenu *ad libitum* konzumacije ST voluminozne krme varirao od 0,42 za mahunarke (Andueza i sur., 2011.) do 0,90 za travnu silažu (Park i sur., 1998.), a za procjenu *ad libitum* konzumacije OT voluminozne krme od 0,8 (Decruyenaere i sur., 2015.; Kneebone i sur., 2015.) do 0,83 (Decruyenaere i sur., 2015.). Razvijena kalibracija za *ad libitum* konzumaciju ST travne silaže (Park i sur., 1997.) (tablica 1) je rezultirala i najnižom SEC, SECV i SEP kao pokazateljima primjenjivosti kalibracije (Landau i sur., 2006.). Prikazane SEP za razvijene kalibracijske modele *ad libitum* konzumacije voluminozne krme (tablica 1) su niže od 7,9 g d⁻¹ (Norris i sur., 1976.) ili 9,6 g d⁻¹ kg⁻¹ M^{0,75} (Ward i sur., 1982.) kako je navedeno.

Broj uzoraka kalibracijskog seta je varirao od 100 (Kneebone i sur., 2015.) do 1012 (Decruyenaere i sur., 2015.) te nisu uočene pravilnosti za razvoj preciznog i pouzdanog NIR kalibracijskog modela za procjenu *ad libitum* konzumacije ST i/ili OT s obzirom na broj uzoraka korištenih za razvoj kalibracije.

Većina razvijenih kalibracijskih modela za procjenu *ad libitum* konzumacije ST i OT voluminozne krme (tablica 1) pokazuje prihvatljivu razinu pouzdanosti procjene (R^2 od 0,7 do 0,9) razvijenog kalibracijskog modela čime se potvrđuje potencijal NIR spektroskopije za procjenu konzumacije ST i OT voluminozne krme.

Ograničavajući čimbenici razvoja NIR predikcijskih kalibracijskih modela za procjenu *ad libitum* konzumacije voluminozne krme su npr. vegetacijska sezona (Hodgson i sur., 1977.) i/ili vrsta, kategorija i kondicija životinja korištenih u biološkom istraživanju te trajanje istraživanja (Marry, 1993.).

Tablica 2. Procjena *in vivo* probavljivosti voluminozne krme NIR spektroskopijom

Table 2 Prediction of *in vivo* forage digestibility by NIR spectroscopy

Voluminozna krma/Forage	N	R ²	SEC	SECV	SEP	Autor
DMD						
Travna silaža /Grass silage	136	0,94	1,65	2,15	2,7	Park i sur. (1998.)
Tedera – mahunarka/legume tedera	92	0,47	-	0,69	3,98	Adriansz i sur. (2017.)
Voluminozna krma/Forage	96	0,85	0,03	-	-	Kneebone i sur. (2015.)
OMD						
Tedera – mahunarka/Legume tedera	92	0,96	-	1,21	1,45	Adriansz i sur. (2017.)
Trave/Grasses	754	0,84	0,024	0,025	0,026	Andueza i sur. (2011.)
Mahunarke/Legumes	141	0,90	0,018	0,021	0,034	Andueza i sur. (2011.)
Voluminozna krma/Forage	951	0,92	0,02	0,02	-	Decruyenaere i sur. (2015.)
Voluminozna krma	96	0,82	0,01	-	-	Kneebone i sur. (2015.)
IVOMD						
DTS/GCM	542	0,90	-	3,0	5,7	Garcia i Cozzolino (2006.)
Sjenaža pašnjak/Haylage	120	0,60	-	3,6	-	Restaino i sur. (2009.)
Oklasak kukuruza/Corn stover	61	0,85	-	10,4	-	Fassio i sur. (2014.)
Kukuruzna silaža/Maize silage	241	0,67	1,69	1,80	-	Maslovarić i sur. (2013.)
Cijela biljka kukuruza/ Whole maize plant	537	0,91	0,23	0,26	-	Campo i sur. (2013.)
Cijela biljka kukuruza/ Whole maize plant	290	0,98	15,8	17,8	-	Cozzolino i sur. (2000.)

n, broj uzoraka; R², koeficijent determinacije; SEC, standardna greška kalibracije; SECV, standardna greška unakrsne validacije; SEP, standardna greška procjene; DTS, djetelinsko travna smjesa / DM, dry matter; OM, organic matter; N, number of samples; R², coefficient of determination; SEC, standard error of calibration; SECV, standard error of cross validation; SEP, standard error of prediction.

PROCJENA IN VIVO PROBAVLJIVOSTI VOLUMINOZNE KRME NIR SPEKTROSKOPIJOM

Utvrđivanje *in vivo* probavljivosti pojedinih komponenti obroka (ST, OT i D-vrijednost) prikazuje potencijal krme i pomaže u planiranju proizvodnje (Beever i Mould, 2000.). Veća D-vrijednost ukazuje na veću konzumaciju ST voluminozne krme (Offer i sur., 1998.; Huhtanen i sur., 2002.).

Osim toga, probavljivost je osnova hranidbene i energetske vrijednosti krme te se široko koristi u selekcijskim programima uzgoja produktivnijih trava veće hranidbene vrijednosti (Moseley i sur., 1988.). Na *ad libitum* konzumaciju i *in vivo* na probavljivost voluminozne krme najveći utjecaj ima sadržaj neutralnih detergent vlakana (NDV) i kiselih detergent vlakana (KDV) u krmi. Koncentracija NDV i KDV se u voluminoznoj krmi povećava s odgađanjem roka košnje biljne mase (Soufizadeh i sur., 2018.). Osim toga, s porastom temperature zraka također dolazi do akumulacije vlakana u voluminoznoj krmi zbog narušavanja balansa između fotosinteze i respiracije biljaka (Rayburn i Sharpe, 2019.). Voluminozna krma sadrži više od 300 g NDV kg⁻¹ ST (Kalivoda, 1990.), a ovisno o primijenjenoj agrotehnologiji uzgoja i skladištenja, sadržaj vlakana može doseći 700 g NDV kg⁻¹ ST (Chamberlain i Wiolkinson, 1996.).

Za razliku od konzumacije, D-vrijednost daje podatak o probavljivosti biljne mase od koje sjenaža potječe, a ovisna je o botaničkom sastavu tratine te fenološkoj fazi razvoja biljne mase u trenutku košnje (McDonald i sur., 1995.).

Voluminozna krma visoke hranidbene vrijednosti ima veću konzumaciju, veću probavljivost i kraće se zadržava u probavnom traktu (Ørskov (1998.) što rezultira većom proizvodnošću životinja (Cushnahan i sur., 1996., Castle, 1975.) uz minimalno dodavanje skupih koncentrata obroku (Steen i sur., 1998.).

U tablici 2. su prikazani rezultati procjene *in vivo* probavljivosti voluminozne krme NIR spektroskopijom

U ranijem pregledu literature korištenja NIR spektroskopije u procjeni probavljivosti različitih vrsta voluminozne krme naveden je R² od 0,8 (Norris, 1976.) ili od 0,654-0,919 (SEC od 2,039-4,101) (Murry, 1993.). U ovom pregledu literature prikazan je širi raspon R² koji iznosi od 0,47-0,98 (tablica 2).

In vivo probavljivost voluminozne krme, kao biloški parametar, teže se procijenjuje NIR spektroskopijom (Stuth i sur., 2003.) zbog pogrešaka u pro-

cjeni reakcija životinja na određenu hranidbu i hranu čije su varijacije obično veće od onih za procjenu kemijskog sastava voluminozne krme (Norris i sur., 1976.). Osim toga, razvoj kalibracijske jednadžbe za biološke parametre ograničava varijacije između životinja (Decruyenaere i sur., 2015.). Kod razvoja NIR kalibracije za procjenu *in vivo* probavljivosti voluminozne krme osnovni problem je nedostatak uzoraka porijeklom iz *in vivo* bioloških istraživanja provedenih pomoću određene vrste životinja s obzirom na vrstu, kategoriju i produkciju, a držanih u kontroliranim uvjetima smještaja i okoline (Marry, 1993.).

Unutar *in vitro* metoda procjene probavljivosti, pouzdanost NIR spektroskopije može varirati radi primijenjenih različitih referentnih metoda poput npr. dvofazne proizvodnje pepsin celulaze (Tilley i Terry, 1963) u usporedbi s tehnikom proizvodnje plina (He i sur., 2020.). Utvrđena je veća korelacija NIR spektroskopije nego kemijskog sastava voluminozne krme za procjenu parametara proizvodnje plina (Andrés i sur., 2005.).

Voluminozna krma je heterogenog sastava pa je posljedično široki raspon varijacija svih utvrđenih parametara unutar uzoraka (Murry, 1993.). Procjenu probavljivosti i konzumacije voluminozne krme NIR spektroskopijom ograničava činjenica što se niti jedan od ta dva parametra ne može utvrditi u kemijskom laboratoriju s visokom razinom točnosti.

ZAKLJUČCI

Ovo istraživanje potvrđuje potencijal NIR spektroskopije za procjenu *ad libitum* konzumacije ST i OT voluminozne krme i *in vivo* probavljivosti ST, OT i D-vrijednosti voluminozne krme. Kod procjene bioloških parametara voluminozne krme NIR spektroskopijom je poseban naglasak stavljen na brzinu procjene od nekoliko minuta u usporedbi s provedbom bioloških istraživanja koja traju po nekoliko mjeseci. Razina pouzdanosti razvijenog kalibracijskog medela, odnosno primjenjivost procijenjenih rezultata bioloških parametara hranidbene vrijednosti voluminozne krme, je ključna odrednica opravdanosti provedbe analiza NIR spektroskopijom za potrebe prakse ili znanstvenog rada. Visoka cijena koštanja NIR aparata i dugotrajnog razvoja kalibracija može biti opravdana ako postoji kontinuirana potreba korištenja NIR spektroskopije na velikom broju uzoraka.

LITERATURA

1. Adriansz, T.D.; Hardy, J.L.M., Milton, J.T.B., Oldham, C.M.; Rea, D. (2017.): Near infrared analysis for nutritive attributes of teder (Bituminaria bituminosa var. albomarginata) Journal of Near Infrared Spectroscopy, 25 (3): 215-218
2. Andres, S.; Murray, I.; Calleja, A.; Javier Giraldez, F. (2005.): Prediction of gas production kinetic parameters of forages by chemical composition and near infrared reflectance spectroscopy. Animal Feed Science and Technology, Amsterdam, 123-124: 487-499.
3. Andreu-Rodriguez J.; Perez-Espinosa, A.; Moral, R.; Agullo, E.; Fernandez-Villena, M.; Fernandezgarcia, M.; Bustamante, M. (2017.): Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the assessment of biomass production and C sequestration by Arundo donax L. in salt-affected environments. Agricultural Water Management, Amsterdam, 183:94-100.
4. Andueza, D.; Picard, F.; Jestin, M.; Andrieu, J.; Baumont, R. (2011.): NIRS prediction of the feed value of temperate forages: efficacy of four calibration strategies. Animal, 5: 1002-1013
5. Andueza, D.; Picard, F.; Martin-Rosset, W.; Aufrère, J. (2016.): Near-Infrared Spectroscopy Calibrations Performed on Oven Dried Green Forages for the Prediction of Chemical Composition and Nutritive Value of Preserved Forage for Ruminants. Applied Spectroscopy, Thousand Oaks, 70 (8): 1321-1327.
6. Beever, D.E.; Mould, F.L. (2000.): Forage evaluation for efficient ruminant livestock production. In: Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M. (Eds.), Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CABI Publishing, Oxon: 15-42.
7. Benvenuti, M. A.; Coates, D. B.; Bindelle, J.; Poppi, D. P.; Gordon, I. J. (2014.): Can faecal markers detect a short term reduction in forage intake by cattle? Animal Feed Science and Technology, Amsterdam, 194: 44-57.
8. Campo, L.; Monteagudo, A. B.; Salleres, B.; Castro P.; Moreno-Gonzalez, J. (2013.): NIRS determination of non-structural carbohydrates, water soluble carbohydrates and other nutritive quality traits in whole plant maize with wide range variability. Spanish Journal of Agricultural Research, 11(2): 463-471.
9. Castle, M.E. (1975.): Silage and milk production. Agricultural progress 50: 53-60.
10. Cozzolino, D.; Fassio, A.; Gimenez, A. (2000.): The use of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81: 142-146.
11. Cushnahan, A.; Mayne, C.S.; Goodall, E.A. (1996.): Effects of stage of maturity and period of ensilage on the production and utilization of grass silage by dairy cows. In: Jones, D.I.H., Jones R., Dewhurst, R., Merry, R., Heigh, P.M. (eds) Proceedings of Eleventh International Silage Conference, IGER, Aberystwyth, 78-79.
12. Decruyenaere, V.; Planchon, V.; Dardenne, P.; Stilman, D. (2015.): Prediction error and repeatability of near infrared reflectance spectroscopy applied to faeces samples in order to predict voluntary intake and digestibility of forages by ruminants. Animal Feed Science and Technology, Amsterdam, 205: 49-59.
13. Demarquilly, C. (1973.): Chemical composition, fermentation characteristics, digestibility and voluntary intake of forage silages: changes compared to initial green forage. Annales de Zootechnie, 22: 1-35.
14. Fassio, A.; Restaino, E.; Cozzolino, D. (2014.): Prediction of fiber fractions, ash and organic matter digestibility in untreated maize stover by near infrared reflectance spectroscopy. Animal Science, 42 (1): 81-86.
15. Fernandes, A. M. F. (2015.): Uso da espectroscopia de reflectância do infravermelho próximo (NIRS) para previsão da composição bromatológica de vagens de algaroba e palma forrageira. 106 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.
16. Garacia, J.; Cozzolino, D. (2006.): Use of near infrared reflectance (NIR) spectroscopy to predict chemical composition of forages in broadbased calibration models. Agricultura Técnica, Chillán, 66: 41-47.
17. He, Y.; Cone, J. W.; Hendriks, W. H.; Dijkstra, J. (2020.): Relationships between chemical composition and in vitro gas production parameters of maize leaves and stems. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 104 (1): 12-21.
18. Henderson, A.R.; Anderson, D.H.; Phillips, P. (1984.): Lamb production from silage. Proceedings of the seventh silage conference, Belfast, 41-42.
19. Hodgson, J.; Rodriguez capriles, J.M.; Fenlon, J.S. (1977.): The influence of sward characteristics on the herbage intake and grazing calves. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 89: 743-750.
20. Huhtanen, P. (1998.): Supply of nutrients and productive responses in dairy cows given diets based on restrictively fermented silage. Agricultural Food Science Finland, 7: 219-250.
21. Huhtanen, P., Khalili, H., Nousiainen, J.I., Rinne, M., Jaakkola, S., Heikkilä, T., Nousiainen, J. (2002.): Prediction of the relative intake potential of grass silage by dairy cows. Livestock Production Science, 73: 111-130.

22. Ibáñez, L.S.; ALOMAR, D. (2008.): Prediction of the chemical composition and fermentation parameters of pasture silage by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Chilean Journal of Agricultural Research*, Chillán, 68 (4): 352-359.
23. Kalivoda, M. (1990.): Školska knjiga, Zagreb.
24. Kneebone, D. G.; Dryden, MCL, G. (2015.): Prediction of diet quality for sheep from faecal characteristics: comparison of near-infrared spectroscopy and conventional chemistry predictive models. *Animal Production Science*, Clayton, 55: 1-10.
25. Landau, S.; Glasser, T.; Dvash, L. (2006.): Monitoring nutrition in small ruminants with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: a review. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, 61: 1-11.
26. Lopez, S.; Carro, M.D.; González, J.S.; Ovejero, F.J. (1991.): The effect of method of forage conservation and harvest season on the rumen degradation of forages harvested from permanent mountain meadows. *Anim. Prod.*, 53: 177-182.
27. Martens, H.; Naes, T. (2001.): *Multivariate calibration*. Chichester, UK: Wiley.
28. Maslovarić, M.; De la Roza-Delgado, B., Janković, S.; Lević, J.; Jovanović, R. (2013). Development of NIR calibration models to predict chemical composition and in vitro organic matter digestibility of maize silage. Conference Paper, Conference: 10th International Symposium „Modern Trends in Livestock Production“, Belgrade Serbia.
29. McDonald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J.F.D.; Morgan, C.A. (1995.): Silage. In: *Animal Nutrition*, 5th Edition, 451-464.
30. McLeod, D.S.; Wilkins, R.J.; Raymond, W.F. (1970.): The voluntary intake by sheep and cattle of silages differing in free acid content. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, 25: 311-319.
31. Molano, M. L.; Cortés, M. L.; Ávila, P.; Martens, S. D.; Muñoz, L. S. (2016.): Ecuaciones de calibración en espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para predicción de parámetros nutritivos en forrajes tropicales. *Tropical GrasslandsForrajes Tropicales*, Cali, 4 (3): 139-145.
32. Moseley, G.; Jones, E.L.; Ramanathan, V. (1988.): The nutritional evaluation of Italian ryegrass cultivars fed as silage to sheep and cattle. *Grass and Forage Science*, 43: 291-295.
33. Murray, I. (1993.): Forage analysis by near infrared spectroscopy. In: Davies, A.; Baker, R. D.; Grant, S. A.; Laidlaw, A. S. (eds.). *Sward management handbook*. 2. ed. Reading, UK: The British Grassland Society, 285-312.
34. Norris, K. H.; Barnes, R. F.; Moore, J. E.; Shenk, J. S. (1976.): Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Science*, Champaign, 43 (4): 889-897.
35. Offer, N.W.; Percival, D.S.; Dewhurst, R.J.; Thomas, C. (1998.): Prediction of the voluntary intake potential of grass silage by sheep and dairy cows from laboratory silage measurements. *Animal Science*, 66: 357-367.
36. Omed, H.M. (1986.): Studies of the relationships between pasture type and quality and the feed intake of grazing sheep. PhD Thesis, University College of Nwales, Bangor, UK, pp271.
37. Ørskov, E.R. (1998.): *The feeding of ruminants*. Rowett Institute Aberdeen, Chalcombe Publications.
38. Park, R.S.; Agnew, R.E.; Gordon, F.J.; Steen, R.W.J. (1998.): The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) on undried samples of grass silage to predict chemical composition and digestibility parameters. *Animal Feed Science and Technology*, 72 (1-2): 155-167.
39. Rayburn, E.B.; Sharpe, P. (2019.): Introduction to Pasture Ecology, 81-91. In: *Horse Pasture Management*, Sharpe, P., Academic press, No of pages 442.
40. Rook, A.J.; Gill, M. (1990.): Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle. 1. Linear regression analysis. *Animal Production*, 50: 425-438.
41. Restaino, E, A.; Fernández, E.G.; La Manna, A.; Cozzolino, D. (2009.). Prediction of the nutritive value of pasture silage by near infrared spectroscopy (NIRS). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69(4): 560-566.
42. Shenk, J.S.; Workman, J.J.; Westerhaus, M.O. (2001.): Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In: Burns D.A., Ciurczak E.W. (eds.). *Handbook of Near-Infrared Spectroscopy*. Marcel Dekker Inc., New York, 419-474.
43. Siddons, R.C.; Paradine, J.; Faria, de V.; Wilkinson, J.M. (1990.): Effects of stage of growth and conservation procedure on the ruminal N degradability of perennial ryegrass. In: *British Society of Animal Production, Winter Meeting*. British Society of Animal Production, Scarborough, paper No 140.
44. Sohn, M.; Himmelsbach, D.S.; Morrison, W.H.; Akin, D.E.; Barton, F.E. (2006.): Partial Least Squares Regression Calibration for Determining Wax Content in Processed Flax Fiber by 14 Near-Infrared Spectroscopy. *Society for Applied Spectroscopy*, 60: 437-440.

45. Soufizadeh, M.; Pirmohammadi, R.; Alijoo, Y.; Khalilvandi Behroozyar, H. (2018.): Indigestible neutral detergent fibers: Relationship between forage fragility and neutral detergent fibers digestibility in total mixed ration and some feedstuffs in dairy cattle. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 9 (1), 49–57.
46. Steen, R.W.; Gordon, F.J.; Dawson, L.E.; Park, R.S.; Mayne, C.S.; Agnew, R.E.; Kilpatrick, D.J.; Porter, M.G. (1998.): Factors affecting the intake of grass silage by cattle and prediction of silage intake, *Animal Science*, 66: 115-127.
47. Stuth, J.; Jama, A.; Tolleson, D. (2003.): Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. *Field Crops Research*, Amsterdam, 84: 45-56.
48. Thomas, S.; Campling, R.C. (1979.): The digestibility of diets containing processed dried lucerne by sheep and cows. *Grass and Forage Science*, 34: 149-152.
49. Thomas, C.; Gibbs, B.G.; Beever, D.E.; Thurnham, B.R. (1988.): The effect of date of cut and barley substitution on gain and on the efficiency of utilisation of grass silage by growing cattle. 1. Gains in live weight and its components. *British Journal of Nutrition*, 60: 297-306.
50. Tilley, J.M.A.; Terry, R.A. (1963.): A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*, 18: 104-111.
51. Vranić, M.; Knežević, M.; Perčulija, G.; Leto, J.; Bošnjak, K.; Rupiće, I. (2004.): Kvaliteta voluminozne krme na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima u Republici Hrvatskoj. Kvaliteta travne silaže na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. *Mljekarstvo*, 54(3): 165-174.
52. Vranić, M.; Knežević, M.; Leto, J.; Perčulija, G.; Bošnjak, K.; Kutnjak, H.; Maslov, L. (2005.): Kvaliteta voluminozne krme na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima u Republici Hrvatskoj: Monitoring kvalitete travne silaže tijekom dvije sezone zimske hranidbe muznih krava. *Mljekarstvo*, 55(4): 283-296.
53. Vranić, M.; Knežević, M.; Bošnjak, K.; Perčulija, G.; Kutnjak, H. (2008.a): Voluntary intake, digestibility and nitrogen utilization by sheep fed ensiled grass clover mixture harvested at three stages of maturity. *Mljekarstvo* 58 (4):357-369.
54. Vranić, M.; Knežević, M.; Bošnjak, K.; Leto, J.; Perčulija, G.; Matić, I. (2008.b): Effects of replacing grass silage harvested at two maturity stages with maize silage in the ration upon the intake, digestibility and N retention in wether sheep. *Livestock Science*, 114, (1): 84-92.
55. Vranić, M.; Bošnjak, K.; Perčulija, G.; Leto, J.; Kutnjak, H.; Pejić, K. (2013.): The feeding value of the ratio based on alfalfa haylage supplemented with high moisture corn in wether sheep. *Acta veterinaria (Beograd)*, 63(4):421-428.
56. Ward, R.G.; Wallace, J.D.; Urquhart, N.S.; Shenk, J.S. (1982.): Estimates of intake and quality of grazed range forage by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Science*, 54: 399-402.
57. Williams, P.C.; Sobering, D.C. (1996.): How do we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations, in *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, ed. By Davies AMC and Williams PC. NIR Publications, Chichester, 185–188.

SUMMARY

The objective of this paper is to present the potential of near-infrared spectroscopy (NIR spectroscopy) as a technology for predicting *ad libitum* intake of dry matter (DM) and organic matter (OM) as well as *in vivo* digestibility of DM, OM and OM in DM (D-value) in forage.

Compared to the expensive, labor-intensive and time-consuming biological research methods for determining forage *ad libitum* intake and *in vivo* digestibility, NIR spectroscopy is a fast, physical, non-destructive, multianalytic and ecologically acceptable method that can provide precise and accurate results with minimal or no sample preparation. Forage biological parameters are more difficult to predict by NIR spectroscopy than chemical parameters due to variations among animals, consequent errors in animal reactions to certain feeds and food and the fact that no biological parameter can be determined in a chemical laboratory with high accuracy level.

The calibration models presented are at acceptable levels of reliability for the prediction of forage *ad libitum* intake and *in vivo* digestibility according to the determined coefficients of determination (R^2) (0.7-0.9 and 0.47-0.98 respectively), standard errors of calibration (SEC) (4.28-6.89 and 0.01-1.69, respectively), standard errors of cross-validation (SECV) (4.53-7.92 and 0.02-2.15, respectively) and standard errors of prediction (SEP) (5.42-9.59 and 0.026-5.7, respectively).

This study confirms the high potential of NIR spectroscopy to predict the *ad libitum* intake of DM and OM and the *in vivo* digestibility of DM, OM and D-values in forage.

Keywords: forage, *ad libitum* intake, *in vivo* digestibility, NIR spectroscopy