

636. 2. 085. 1: 547. 458. 81
636. 2. 085. 2

INSTITUUT VOOR VEEVOEDINGSONDERZOEK „HOORN”

EEN SNELLE METHODE OM DE CELLULOLYTISCHE
ACTIVITEIT VAN PENSVOCHT TE BEPALEN

WITH A SUMMARY
A QUICK METHOD TO DETERMINE THE CELLULOLYTIC
ACTIVITY OF RUMEN FLUID

K. STOLK

CENTRUM VOOR

LANDBOUWPUBLIKATIES



LANDBOUWDOCUMENTATIE

VERSL. LANDBOUWK. ONDERZ. NO. 65.13 — WAGENINGEN — 1959

225739

INHOUD

	Blz.
I. INLEIDING	5
1. IJking van de viscosimeter	6
II. METHODIEK	8
1. Bereiding van de CMC-oplossing	8
2. Incubatie met pensvocht	8
3. Meting van de viscositeit	9
III. RESULTATEN	10
1. Invloed van de incubatietijd	10
2. Invloed van de voorbehandeling	10
3. Invloed van het ruwvoederrantsoen	11
4. Invloed van het vetgehalte van het krachtvoer	15
SAMENVATTING	17
SUMMARY	19
LITERATUUR	20

De auteur, K. STOLK, was ten tijde van het onderzoek bacterioloog-biochemicus aan het Instituut voor Veevoedingsonderzoek „Hoorn”.

I. INLEIDING

Het vermogen van de in hun pens levende micro-organismen om cellulose af te breken en om te zetten in bruikbare componenten, is voor de voeding van herkauwers van het allergrootste belang. Hierdoor worden deze dieren in staat gesteld te leven van gras en andere gewassen die rijk aan ruwe celstof zijn. Het is daarom begrijpelijk, dat het wetenschappelijk veevoedingsonderzoek de laatste jaren veel aandacht schonk aan de voorwaarden die deze cellulose-afbraak beheersen. Het zijn vooral de schommelingen in de cellulolytische activiteit van het pensvocht en de methoden om deze te bestuderen, waar de wetenschappelijke interesse zich op richtte.

Zo bepaalden verschillende onderzoekers de cellulolytische activiteit van pensvocht door dit laatste in zogenaamde kunstpensen gedurende 24 à 36 uur te incuberen met cellulosehoudend materiaal zoals luzernemeel (HUHTANEN, SAUNDERS en GALL, 1954), Solka-Floc 40A (HERSHBERGER, BENTLEY en MOXON, 1955; CHENG, HALL en BURROUGHS, 1955), filtreerpapier of hooi (ZORITA en CALVO DE ZORITA, 1956), fijngemalen maïskolven (BURROUGHS, GERLAUGH en BETHKE, 1950), en filtreerpapier of strocellulose (FRENS en STOLK, 1957). De vermindering van de aanwezige hoeveelheid cellulose werd dan als maat genomen voor de cellulolytische activiteit.

De cellulosebepaling werd door de onderscheiden onderzoekers op zeer uiteenlopende wijze uitgevoerd. Voor het door ons zelf (FRENS en STOLK, 1957) gebruikte materiaal, bleek de ruwe-celstofmethode (STOLK, 1956) bruikbare uitkomsten te geven. Door de regelmatig optredende filtratie-moeilijkheden van de inhoud der kunstpensen was deze methode echter zeer tijdrovend, zodat de resultaten van de uitgevoerde proeven eerst na geruime tijd bekend werden.

Wij hadden daarom behoefte aan een snellere werkwijze om de cellulolytische activiteit van monsters pensvocht te meten. Voor ons wellicht geschikte methodes werden aangegeven door OYART (1953) en CASON en THOMAS (1955), die als maatstaf voor de cellulolytische activiteit, de viscositeitsvermindering namen van een oplossing van carboxymethylcellulose (CMC), welke gedurende een bepaalde tijd met een bepaalde hoeveelheid pensvocht werd geïncubeerd. Hoewel CMC geen natuurlijke cellulose is, en derhalve niet in het voedsel van de herkauwers en dus ook niet in de pensinhoud voorkomt, leek het ons toch zeer waarschijnlijk dat er een parallelle zou kunnen bestaan tussen de aantasting van CMC en de aantasting van de natuurlijke cellulosesoorten van het voederrantsoen.

OYART (1953) mat de viscositeit na 30 minuten incuberen bij 40°C, terwijl CASON en THOMAS (1955) de tijd maten, die nodig was om de viscositeit tot op 50% van de oorspronkelijke waarde te doen verminderen. Laatstgenoemde onderzoekers deden hun metingen met een Ostwald-Fenske-viscosimeter en gebruikten per bepaling 6 ml vloeistof, bestaande uit 1 ml pensvocht en 5 ml CMC-oplossing. Om het tijdstip van 50% vermindering vast te stellen zijn uiteraard meerdere metingen nodig en dit maakt de methode van CASON en THOMAS (1955) vrij omslachtig.

De werkwijze van OYART (1953) waarbij met een viscosimeter volgens HÖPPLER (1933) gewerkt werd leek ons eenvoudiger, sneller en doelmatiger. Wij hebben deze daarom nader voor onze proefomstandigheden uitgewerkt.

1. IJKING VAN DE VISCOSIMETER

Alvorens wij tot het eigenlijke onderzoek overgingen, ijkten wij eerst de viscosimeter met behulp van een drietal monsters olie van bekende viscositeit, die ons welwillend ter beschikking gesteld werden door het laboratorium van de Koninklijke Shell/B.P.M. te Amsterdam. In deze oliën verrichtten wij viscositeitsmetingen met ons toestel. Uit de verkregen cijfers berekenden wij op de door HÖPPLER (1933) aangegeven wijze de absolute viscositeit in cP bij 25°C.

Voor ijkolie 47 M was opgegeven een viscositeit van $5,35 \pm 0,03$ cP; wij vonden met ons toestel met kogel a $5,38 \pm 0,02$ cP en met kogel b $5,28 \pm 0,03$ cP.

Voor ijkolie 62 F was opgegeven $145,6 \pm 0,7$ cP; wij vonden met kogel c $141,1 \pm 0,3$ cP.

Voor ijkolie 84 A was opgegeven $243,0 \pm 1,2$ cP; wij vonden met kogel c $234,6 \pm 0,8$ cP en met kogel d $238,8 \pm 1,2$ cP.

De uitkomsten met ons toestel met kogel c waren wat aan de lage kant, maar voor het doel dat ons met deze metingen voor ogen stond, menen wij dat de afwijkingen niet te groot zijn.

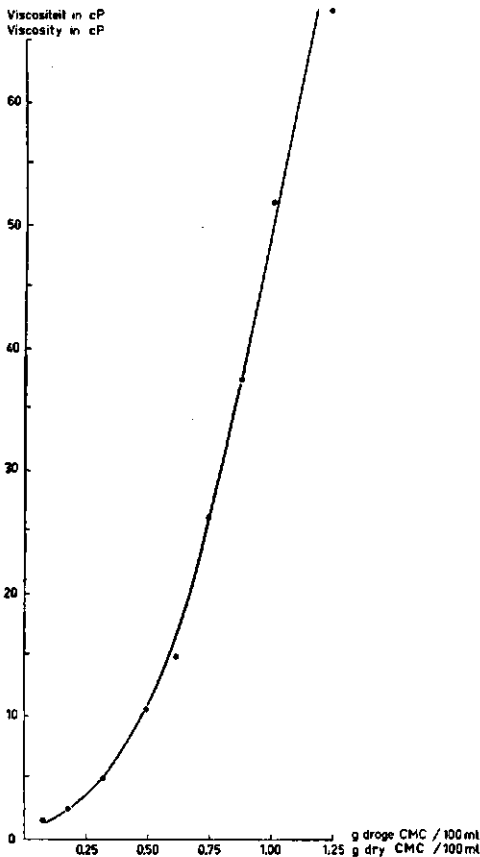


FIG. 1. Viscositeit in cP voor verschillende hoeveelheden CMC in water

Opm. De viscositeit van de desbetreffende oplossing werd onmiddellijk na de bereiding gemeten

FIG. 1. Viscosity given in cP for different weights of CMC in water

Note: The viscosity of the solution in question was measured immediately after it had been prepared

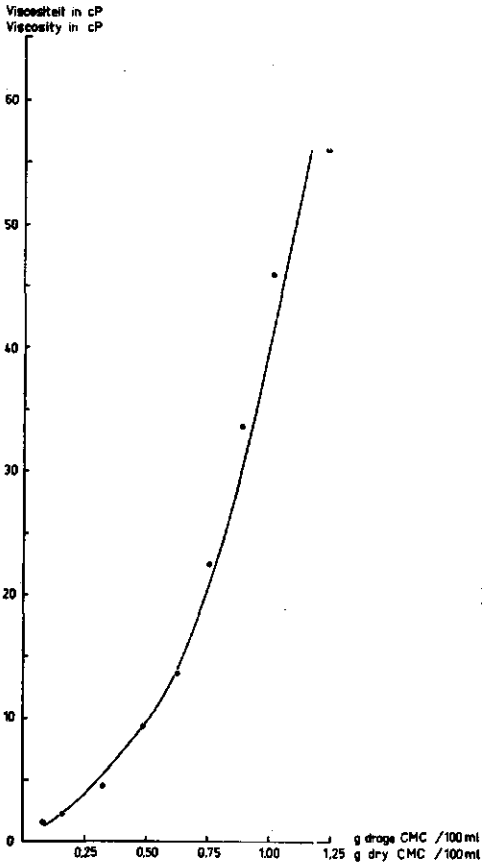


FIG. 2. Viscositeit in cP voor verschillende hoeveelheden CMC in water

Opm. De desbetreffende oplossingen werden behandeld alsof geënt was met pensinhoud. Ze werden dus eerst 30 min. geïncubeerd bij 40°C, afgekoeld in ijswater, 10 min. gepasteuriseerd bij 100°C en tot de volgende dag in een fridaire geplaatst. Daarna werden de oplossingen op 25°C gebracht en de viscositeit gemeten.

FIG. 2. Viscosity in cP for different weights of CMC in water

Note: The solutions in question were treated as if had been incubated with rumen fluid. So they were first incubated at 40°, cooled in icewater, pasteurized for 10 minutes at 100° and put in a refrigerator till the next day. After that the temperature of the solutions was raised to 25° and the viscosity was measured.

II. METHODIEK

Bij aantasting van de CMC door hydrolyse of door verdere afbraak, bleek de viscositeit van de oplossing af te nemen, zodat, indien de viscositeit van de oplossing hoofdzakelijk bepaald wordt door de overgebleven CMC en in mindere mate door de hydrolyse- of afbraakproducten, de vermindering van de viscositeit als een maat voor de aantasting is te beschouwen. Het verband tussen de viscositeit en de hoeveelheid opgeloste CMC (omgerekend in grammen droge stof per 100 ml aqua dest.) bleek niet rechtlijnig te zijn (figuur 1). Vooral bij de hogere viscositeiten werd een invloed van verwarming op de viscositeit gevonden (figuur 2).

Na een aantal oriënterende proeven, die verricht werden met pensvocht afkomstig van een koe met een gesloten pensfistel, kwamen wij tot de conclusie dat de volgende werkwijze voor ons doel het beste bruikbaar was.

1. BEREIDING VAN DE CMC-OPLOSSING

18,4 g CMC premium medium¹ werden opgelost in 800 ml aqua dest. De hierbij optredende klontenvorming bleek zeer goed te kunnen worden voorkomen, door de hoeveelheid CMC te overgieten met een weinig alcohol 96 % en vervolgens bij porties in een mortier aan te wrijven met aqua dest. De aldus verkregen porties werden in een elektrische mixer, waarvan de messen door een driebladige schroef vervangen waren, gedurende enige uren krachtig geroerd onder toevoeging van 500 mg Na₂HPO₄, 165 mg KH₂PO₄ en het restant aqua dest. De oplossing werd daarna in een steriele kookkolf van 1 l gedurende 30 minuten in een stoempot gepasteuriseerd en na bekoeling in een ijskast bewaard. De CMC-oplossing, die voldoende was voor twee bepalingssreeksen, werd iedere week opnieuw klaargemaakt.

2. INCUBATIE MET PENSVOCHT

De kolf met CMC-oplossing werd voor het gebruik gedurende een half uur in een waterbad van 40°C geplaatst, waarna nauwkeurig 41 g van de CMC-oplossing in steriele erlenmeyer-kolfjes van 100 ml werd afgewogen. Een gewichtsverschil van ten hoogste 20 mg werd toegelaten. Per proef werden 9 kolfjes gereed gemaakt. De kolfjes werden vervolgens opgehangen in een waterbad, dat met behulp van een contactthermometer en een krachtige roerinrichting op 40°C ± 0,2°C gehouden werd. Daarna werd pensvocht, dat op de door FRENS en STOLK (1957) beschreven wijze van koeien uit een voederproef of van een koe met een gesloten pensfistel was afgenomen, in een hoeveelheid van 35 ml per kolfje toegevoegd en gedurende precies 30 minuten in het waterbad geïncubeerd. Per duplo-bepaling werd in een kolfje 35 ml gesteriliseerd pensvocht gebracht, zodat de negen met CMC-gevulde kolfjes voldoende waren om het pensvocht van maximaal drie koeien gelijktijdig te onderzoeken. Direct na het enten werd het betreffende kolfje voorzichtig omgezwinkt om menging van het pensvocht met de CMC-oplossing te bevorderen. Na de incubatietijd werd het kolfje

¹ Ons welwillend ter beschikking gesteld door de Hercules Powder Company, Wilmington, U.S.A., verkoopkantoor voor Nederland, J. W. Frisolaan 3, 's-Gravenhage.

onmiddellijk in een bak met ijs en water geplaatst. Nadat de inhoud goed was afgekoeld, werd gedurende 10 minuten bij 100°C in een stoompot gepasteuriseerd. Hierna werden de kolfjes in een ijskast bewaard tot de volgende dag.

3. METING VAN DE VISCOSITEIT

De kolfjes werden gedurende een half uur in een waterbad geplaatst dat door middel van een contact-thermometer op 25°C gehouden werd. Vervolgens werd de inhoud van de kolfjes gedurende 10 minuten in steriele centrifugebuizen in een Eccocentrifuge gecentrifugeerd (4400 × g). De bovenstaande vloeistof werd overgeschonken in steriele erlenmeyer-kolfjes van 100 ml en deze werden opnieuw in het waterbad van 25°C geplaatst. Hierna werd het soortelijk gewicht bij 25°C bepaald met de balans van MOHR, en werd de viscositeit gemeten met een viscosimeter volgens HÖPPLER (1933). Wij hadden de beschikking over een zogenaamde industrie-uitvoering van de viscosimeter volgens HÖPPLER (uitvoering: Gebr. Haake, Berlijn, model CH), waarbij de temperatuur tot op ± 0,2°C geregeld kon worden met behulp van het ingebouwde verwarmingselement, een fijn regelbare contactweerstand (model Sunic) en een eenvoudig pompmechanisme.

Door HÖPPLER (1933) is langs experimentele weg gevonden dat de viscositeit voor een dergelijk type viscosimeter gegeven werd door de formule:

$$\eta = t (s_k - s_f) \times K$$

waarin: η = viscositeit in cP
 t = valtijd van de kogel in seconden over 5,0 cm
 s_k = soortelijk gewicht van de kogel
 s_f = soortelijk gewicht van de vloeistof
 k = kogelconstante

III. RESULTATEN

1. INVLOED VAN DE INCUBATIETIJD

Met pensinhoud verkregen van een koe met een gesloten pensfistel werd, zowel tijdens de stal- als tijdens de weideperiode, de invloed van de incubatietijd nagegaan. Hiertoe werden de desbetreffende kolfjes na enting met pensvocht gedurende precies 15, 30 of 45 minuten in het waterbad van 40°C gehouden.

TABEL 1. Aantasting in % van CMC door pensvocht ¹ voor verschillende incubatietijden

Datum	Incubatietijd		
	15 min	30 min	45 min
26/2/57	21,8	25,6	—
7/3/57	18,6	22,8	25,4
28/5/57	68,6	69,4	—
4/6/57	—	66,1	67,2
Date	15 min	30 min	45 min
	Period of incubation		

¹ Het pensvocht was afkomstig van een koe met een gesloten pensfistel. De incubatietemperatuur was 40°C.

¹ The rumen fluid was obtained from a cow with a fistula. The temperature of incubation was 40°C.

TABEL 1. Affection in % of CMC by rumen fluid ¹ for different periods of incubation

Alhoewel uit onze resultaten (zie tabel 1) bleek, dat het verschil in aantasting van de CMC niet in sterke mate afhangt van de incubatietijd, werd toch de door OYART (1953) aangegeven incubatietijd van 30 minuten aangehouden.

2. INVLOED VAN DE VOORBEHANDELING

OYART (1953) vond een sterke achteruitgang van de cellulolytische activiteit van pensvocht ten opzichte van CMC, door aan de incubatie voorafgaande centrifugatie van het pensvocht.

Het pensvocht dat hier gebruikt werd, was afkomstig van een koe met een gesloten pensfistel. In dit pensvocht waren, wellicht mede door de wijze waarop het vocht verzameld werd, vooral tijdens de stalperiode vrijwel geen vaste bestanddelen aanwezig. Een vermindering van de cellulolytische activiteit ten gevolge van centrifugatie van het pensvocht, werd door ons dan ook alleen gevonden gedurende de weideperiode en niet tijdens de stalperiode (tabel 2).

TABEL 2. Aantasting in % van CMC in afhankelijkheid van de voorbehandeling van het pensvocht ¹

Datum	Niet behandeld	Gecentrifugeerd	Gecentrifugeerd en gefiltreerd ²
27/12/56	24,1	25,0	8,0
10/ 1/57	25,0	28,6	13,5
15/ 1/57	20,6	18,0	5,1
17/ 1/57	22,7	24,2	2,5
Gemiddeld Average	23,1	24,0	7,3
6/ 6/57	58,9	35,5	—
25/ 6/57	51,9	34,3	—
2/ 7/57	65,5	36,9	—
10/ 7/57	60,4	51,0	—
Gemiddeld Average	59,2	39,4	—
Date	Not treated	Centrifuged	Centrifuged and filtered

Het pensvocht was afkomstig van een koe met een gesloten pensfistel.

Het gecentrifugeerde pensvocht werd gefiltreerd door een Seitz-filter; in verband met de filtratieduur werden deze bepalingen voor de weideperiode niet uitgevoerd. De incubatietijd was 30 minuten, de incubatietemperatuur 40°C.

¹ The rumen fluid was obtained from a cow with a fistula.

² The rumen fluid that had been centrifuged was filtered through a Seitz-filter; in connection with the period of filtration these measurements were not carried out during the pasture period. The period of incubation was 30 minutes at a temperature of 40°C.

TABEL 2. Affection in % of CMC depending on the pre-treatment of the rumen fluid ¹

3. INVLOED VAN HET RUWVOEDERRANTSOEN

De beschreven methode werd toegepast op pensinhoud van koeien, waarmee in de winters van 1956—1957 en 1957—1958 voederproeven werden uitgevoerd.

Bij de voederproef in de winter van 1956—1957 werden in de hoofdperiode een voordroogsilage (groep III) en een melasse-silage (groep IV) gevoerd. Bovendien werden 20 kg voederbieten per dier per dag verstrekt aan de koeien in groep III gedurende de hoofdperiode, terwijl aan de koeien in groep IV in de tweede helft der hoofdperiode (ingaaande 16/2/57) 1 kg stro per dier per dag gegeven werd. Tijdens de voor- en naperiode werd aan beide groepen hetzelfde rantsoen verstrekt, namelijk respectievelijk een Hollandse kuil en een melasse-silage.

Een indruk van de cellulolytische activiteit van de pensvochten van de koeien afkomstig uit de beide groepen, werd verkregen door met behulp van figuur 2 uit de gevonden viscositeiten de bijbehorende hoeveelheden CMC af te lezen. De aldus gevonden hoeveelheden CMC voor de kolfjes gevuld met CMC-oplossing en steriel pensvocht werden steeds 100% gesteld, waarna de aantasting (i.c. afbraak) van de CMC kon worden vastgesteld (tabel 3).

TABEL 3. Aantasting in % van CMC door pensinhoud afkomstig van koeien op een verschillend ruwvoederrantsoen

Voorperiode	Datum		Aantasting CMC in %		Control period I
		3/1/57	75,0	3/1/57	
	3/1/57	66,7	8/1/57	39,6	
	8/1/57	38,9	8/1/57	38,9	
	Gemiddeld Average	60,26 ± 8,88			
Hoofperiode 1	Groep III		Groep IV		Experimental period 1
	Datum	Aantasting CMC in %	Datum	Aantasting CMC in %	
	22/1/57	40,3	22/1/57	13,7	
	24/1/57	24,7	24/1/57	30,3	
	30/1/57	35,4	24/1/57	21,8	
	30/1/57	60,6	30/1/57	22,8	
	7/2/57	58,9	7/2/57	26,0	
	12/2/57	69,0	14/2/57	39,3	
	14/2/57	36,2	14/2/57	43,1	
	Gemiddeld Average	46,87 ± 5,94		28,14 ± 3,89	
Hoofperiode 2	19/2/57	68,6	19/2/57	79,5	Experimental period 2
	21/2/57	56,4	19/2/57	76,1	
	28/2/57	51,2	21/2/57	53,2	
	28/2/57	42,1	21/2/57	79,5	
	12/3/57	50,6	28/2/57	49,6	
	14/3/57	28,3	12/3/57	43,5	
			14/3/57	56,9	
	Gemiddeld Average	49,53 ± 5,54		62,61 ± 5,79	
Naperiode	26/3/57	40,7	26/3/57	51,4	Control period II
	28/3/57	58,9	26/3/57	33,3	
	28/3/57	66,6	28/3/57	72,6	
	2/4/57	59,4	2/4/57	52,9	
	9/4/57	58,4	2/4/57	49,0	
	11/4/57	57,2	9/4/57	69,6	
	16/4/57	38,0	9/4/57	49,8	
			11/4/57	56,7	
			11/4/57	50,2	
			16/4/57	48,8	
Gemiddeld Average	54,17 ± 4,01		53,43 ± 3,39		
Date	Affection of CMC in %	Date	Affection of CMC in %		

TABEL 3. Affection in % of CMC by rumen fluid obtained from cows receiving different rations of roughage

Op de door FISHER (1954) in "Statistical Methods" op pag. 122 e.v. aangegeven wijze werden de middelbare afwijkingen van de gevonden CMC-afbraakcijfers bepaald. Met behulp van de op pag. 174 vermelde t-tabel werd nagegaan of er tussen de CMC-afbraakcijfers in de verschillende periodes significante verschillen bestonden. Het verschil werd hierbij als significant beschouwd, als er een zekerheid bestond van 95 %, dus wanneer de bij de t-waarden uit de t-tabel behorende P-waarde 0,05 was.

Er werden alleen significante verschillen gevonden tussen de voorperiode en de hoofdperiode 1 van groep IV ($P < 0,01$), tussen de hoofdperiode 1 van groep III en de hoofdperiode 1 van groep IV ($0,02 > P < 0,05$), en tussen de hoofdperiodes 1 en 2 van groep IV ($P < 0,01$).

Bij nadere beschouwing van de resultaten bleek, dat de goede CMC-afbraak tijdens de voorperiode, bij de overgang naar de verwelkingssilage (groep III, hoofdperiode 1) een duidelijke alhoewel niet significante daling onderging ($0,2 > P < 0,3$). Bij de overgang naar de melasse-silage (groep IV, hoofdperiode 1) werd een sterke, duidelijk significante daling van de CMC-afbraak gevonden. Deze daling verdween snel en volkomen na bijvoeding van 1 kg stro per dier per dag. In dit verband kan worden opgemerkt, dat een koe (no. 20) die geen stro opnam en derhalve bij groep IV hoofdperiode 2 buiten beschouwing werd gelaten, de volgende CMC-afbraakcijfers gaf:

Hoofdperiode 1	= 43,1 %
Hoofdperiode 2	= 51,0 %
Naperiode	= 52,9 %

Het achterwege blijven van een scherpe daling in de CMC-afbraakcijfers bij de voeding van de melasse-silage in de naperiode, is in dit licht bezien nog niet duidelijk.

Uit de voorlopige resultaten van deze voederproef bleek, dat bij de overgang van de voorperiode naar groep IV hoofdperiode 1 en van groep III hoofdperiode 2 naar de naperiode, het vetgehalte van de melk scherp daalde. Daarentegen kwam de bijvoeding van het stro op geen enkele wijze tot uiting in een verandering van het vetgehalte van de melk.

Bij de in de winter van 1957—1958 uitgevoerde voederproef werden de koeien in zes groepen van vijf verdeeld (groep I t/m VI). In de hoofdperiode ontvingen de koeien van de groepen I en VI als ruwvoeder melasse-silage, die van de groepen II en V melasse-silage met hooi en die van de groepen III en IV hooi. Het krachtvoer dat aan de koeien van de groepen IV, V en VI werd verstrekt, bevatte 4,7 % extra vet (geëmulgeerd destructor-vet); het krachtvoer voor de koeien van de groepen I, II en III bevatte geen extra vet. In de voor- en naperiode werd aan alle koeien hetzelfde rantsoen verstrekt, namelijk respectievelijk een voordroogkuil met hooi en een melasse-silage met hooi. Het krachtvoer, dat in de voor- en naperiode verstrekt werd, bevatte geen extra vet.

Daar vooral in de voor- en naperiode voor enkele groepen het aantal waarnemingen te gering was en de schommelingen in de gevonden CMC-afbraakcijfers te groot waren om een indruk per groep van vijf koeien te krijgen, werden de groepen die hetzelfde ruwvoederrantsoen ontvingen twee bij twee bij elkaar genomen.

TABEL 4. Aantasting in % van CMC door pensinhoud afkomstig van koeien op een verschillend ruwvoederrantsoen

Voorperiode	Voeder groepen					
	I en VI		II en V		III en IV	
	Datum	Aantasting CMC in %	Datum	Aantasting CMC in %	Datum	Aantasting CMC in %
Voorperiode	17/12/57	70,3	17/12/57	61,6	17/12/57	69,2
	19/12/57	45,8	19/12/57	54,8	19/12/57	48,2
	2/ 1/58	60,1	2/ 1/58	39,4	2/1/58	53,5
	7/ 1/58	73,5	7/ 1/58	80,8	7/1/58	85,6
	9/ 1/58	46,2	9/ 1/58	57,6		
	Gemiddeld Average	59,18 ± 5,82	Gemiddeld Average	58,84 ± 6,66	Gemiddeld Average	64,12 ± 8,43
Hoofdperiode	21/1/58	69,9	28/1/58	64,1	21/1/58	63,0
	28/1/58	58,9	4/2/58	41,5	28/1/58	55,9
	4/2/58	51,4	25/2/58	66,4	4/2/58	44,7
	18/2/58	60,3	13/3/58	80,1	20/2/58	60,1
	6/3/58	46,7			4/3/58	62,0
	Gemiddeld Average	57,44 ± 3,98	Gemiddeld Average	63,02 ± 8,00	Gemiddeld Average	57,14 ± 3,34
Napieride	25/3/58	80,5	27/3/58	86,2	1/4/58	78,7
	27/3/58	82,7	1/4/58	71,9	10/4/58	83,0
	15/4/58	84,2	15/4/58	74,0	10/4/58	87,8
	17/4/58	75,0	17/4/58	71,9	17/4/58	81,5
	Gemiddeld Average	80,60 ± 2,02	Gemiddeld Average	77,80 ± 3,18	Gemiddeld Average	82,75 ± 1,90
	Date	Affection of CMC in %	Date	Affection of CMC in %	Date	Affection of CMC in %
	I and VI		II and V		III and IV	
	Feeding-groups					
	Control period I					
	Experimental period					
	Control period II					

TABEL 4. Affection in % of CMC by rumen fluid obtained from cows receiving a different ration of roughage

Uit de resultaten die in tabel 4 zijn samengevat, konden op de door FISHER (1954) aangegeven wijze significante verschillen berekend worden voor de CMC-afbraakcijfers van de groepen I en VI en de groepen III en IV in de hoofdperiode en in de naperiode (in beide gevallen was $P < 0,01$). Voor de groepen II en V was er voor de CMC-afbraakcijfers in de hoofdperiode en in de naperiode geen significant verschil ($0,1 > P < 0,2$). In de hoofdperiode werden voor de groepen I en II, de groepen II en V en de groepen III en IV geen significante verschillen gevonden.

4. INVLOED VAN HET VETGEHALTE VAN HET KRACHTVOER

Om na te gaan of enige invloed van de verstrekking van het extra vet kon worden waargenomen, werden de gevonden CMC-afbraakcijfers in voor-, hoofd- en naperiode van de groepen I, II en III en van de groepen IV, V en VI per periode bij elkaar genomen. De aldus verkregen resultaten zijn in tabel 5 vermeld.

Er werden alleen significante verschillen in de CMC-afbraakcijfers gevonden tussen de hoofdperiode en de naperiode voor de groepen I, II en III ($P < 0,01$) en tussen de hoofdperiode en de naperiode voor de groepen IV, V en VI ($0,02 > P < 0,05$). In de hoofdperiode was er geen significant verschil tussen de groepen I, II en III en de groepen IV, V en VI ($0,2 > P < 0,3$).

Bij nadere beschouwing van de resultaten bleek, dat er geen verschillen gevonden werden in de CMC-afbraakcijfers tijdens de voorperiode en tijdens de hoofdperiode. Het extra vet had derhalve geen duidelijk merkbare invloed op de cellulolytische activiteit van het pensvocht van de desbetreffende koeien.

Uit de voorlopige resultaten van de voederproef 1957—1958 bleek de verstrekking van extra vet in het krachtvoer ook geen invloed te hebben op het vetgehalte van de melk. Een stijging van het vetgehalte van de melk in de naperiode werd echter niet waargenomen.

TABEL 5. Invloed van de verstrekking van extra vet in het krachtvoer op de aantasting in % van CMC door pensinhoud afkomstig van koeien op een verschillend ruwvoederrantsoen

	Groepen I, II en III		Groepen IV, V en VI		
	Datum	Aantasting CMC in %	Datum	Aantasting CMC in %	
Voorperiode	Vetgehalte van het krachtvoer 3,4 %		Fat content of the concentrates 3,4 %		Control period I
	17/12/57	70,3	17/12/57	61,6	
	17/12/57	69,2	19/12/57	45,8	
	19/12/57	54,8	19/12/57	48,2	
	2/1/58	60,1	2/1/58	39,4	
	2/1/58	53,5	7/1/58	73,5	
	7/1/58	80,8	7/1/58	85,6	
	9/1/58	46,2	9/1/58	57,6	
	Gemiddeld Average	62,13 ± 4,50	Gemiddeld Average	58,81 ± 6,17	
	Hoofdperiode	Vetgehalte van het krachtvoer 8,1 %		Fat content of the concentrates 8,1 %	
21/1/58		69,9	28/1/58	58,9	
21/1/58		63,0	28/1/58	55,9	
28/1/58		64,1	4/2/58	41,5	
4/2/58		51,4	4/2/58	62,0	
4/2/58		44,7	6/3/58	46,7	
18/2/58		60,3			
20/2/58		60,1			
25/2/58		66,4			
13/3/58		80,1			
Gemiddeld Average	62,22 ± 3,40	Gemiddeld Average	53,00 ± 3,85		
Naperiode	Vetgehalte van het krachtvoer 3,4 %		Fat content of the concentrates 3,4 %		Control period II
	25/3/58	80,5	27/3/58	82,7	
	27/3/58	86,2	1/4/58	71,9	
	1/4/58	78,7	10/4/58	83,0	
	10/4/58	87,8	17/4/58	75,0	
	15/4/58	84,2			
	15/4/58	74,0			
	17/4/58	79,1			
	17/4/58	81,5			
	Gemiddeld Average	81,50 ± 1,58	Gemiddeld Average	78,15 ± 2,77	
	Date	Affection of CMC in %	Date	Affection of CMC in %	
	Groups I, II and III		Groups IV, V and VI		

TABEL 5. Influence of the provision with extra fat in the concentrates on the affection in % of CMC by rumen fluid obtained from cows receiving different roughage

SAMENVATTING

Nader onderzocht werd de door OYART (1953) aangegeven methode, waarbij de cellulolytische activiteit van pensvocht werd bepaald, door de verandering van de viscositeit van een waterige oplossing van carboxymethylcellulose (CMC) na incubatie met pensvocht. Hierbij werd vooral aandacht geschonken aan de voorbehandeling van de CMC-oplossing, aan de voorbehandeling van het pensvocht, aan de incubatietechniek, en aan de invloed van de hoeveelheid CMC op de viscositeit. Dit onderzoek gaf aanleiding tot de ontwikkeling van een methode, die aansloot bij die van OYART (1953), maar waarbij de grootte van de CMC-aantasting als een maat voor de cellulolytische activiteit werd genomen.

Deze methode werd toegepast om de cellulolytische activiteit van het pensvocht bij koeien te bepalen, waarmee in de winters van 1956—1957 en van 1957—1958 voederproeven werden uitgevoerd. Bij de voederproef die in de winter van 1956—1957 werd genomen, werd de voederwaarde van gras geënsileerd volgens de voordroogmethode (groep III), vergeleken met de voederwaarde van gras geënsileerd volgens de koude methode onder toevoeging van melasse (groep IV). In de voor- en naperiode ontvingen alle koeien hetzelfde ruwvoeder, namelijk respectievelijk een Hollandse kuil en een melasse-silage.

Uit de gevonden CMC-afbraakcijfers bleek, dat er voor groep IV een sterke daling in de cellulolytische activiteit optrad in de eerste helft van de hoofdperiode. De daling verdween in de tweede helft van de hoofdperiode toen 1 kg stro per dier per dag bijgevoerd werd. Er werd geen daling van de cellulolytische activiteit in de naperiode waargenomen. Voor groep III werden geen significante verschillen voor de verschillende perioden gevonden.

Uit de voorlopige gegevens over het vetgehalte van de melk gedurende de voederproef 1956—1957 bleek, dat er voor de koeien uit groep IV een daling optrad in de hoofdperiode. Er werd geen invloed gevonden van de bijvoeding van het stro. In de naperiode werd eveneens een daling van het vetgehalte van de melk gevonden. Voor de koeien uit groep III werd alleen een daling van het vetgehalte van de melk gevonden in de naperiode. Er bleek derhalve geen goede aansluiting te zijn tussen de dalingen van het vetgehalte en de CMC-afbraakcijfers of de cellulolytische activiteit.

Bij de voederproef die in de winter van 1957—1958 werd genomen, werden de koeien in zes groepen van elk vijf stuks verdeeld (groep I t/m groep VI). Gedurende de hoofdperiode ontvingen twee groepen steeds hetzelfde ruwvoeder, namelijk de groepen I en VI melasse-silage, de groepen II en V melasse-silage met hooi, en de groepen III en IV hooi. De groepen IV, V en VI kregen tijdens de hoofdperiode 4,7% extra vet in het krachtvoer. In de voor- en naperiode ontvingen alle groepen het normale krachtvoer (vetgehalte 3,4%); als ruwvoeder ontvingen de groepen in de voorperiode voordroogkuil met hooi en in de naperiode melasse-silage met hooi.

Daar vooral in de voor- en naperiode het aantal bepalingen van de CMC-afbraakcijfers voor enkele groepen te gering was, werden de gevonden cijfers voor de groepen I en VI, voor de groepen II en V en voor de groepen III en IV per periode twee bij twee bij elkaar genomen (tabel 4). Uit de gevonden resultaten konden alleen voor de

groepen I en VI en voor de groepen III en IV tussen de hoofdperiode en de naperiode significante verschillen berekend worden.

Om de invloed van de verstrekking van het extra vet in het krachtvoer na te gaan, werden de gevonden CMC-afbraakcijfers voor de groepen I, II en III en voor de groepen IV, V en VI voor iedere periode bij elkaar genomen. Uit de gevonden resultaten konden significante verschillen berekend worden tussen de hoofdperiode en de naperiode voor de groepen I, II en III, en voor de groepen IV, V en VI. In de hoofdperiode werd geen significant verschil gevonden tussen de CMC-afbraakcijfers voor de groepen I, II en III en de groepen IV, V en VI.

Uit de voorlopige gegevens van de voederproef 1957—1958 bleek, dat er geen stijging van het vetgehalte van de melk optrad bij verstrekking van extra vet in het krachtvoer. Er werd echter geen stijging van het vetgehalte van de melk geconstateerd in de naperiode.

SUMMARY

A QUICK METHOD TO DETERMINE THE CELLULOLYTIC ACTIVITY OF RUMEN FLUID

A study was made of the method given by OYART (1953) to determine the cellulolytic activity of rumen fluid by the change of the viscosity of a solution of carbomethylcellulose (CMC) after incubation with rumen fluid. Special attention was paid to the pre-treatment of the CMC-solution, to the pre-treatment of the rumen fluid, to the technique of incubation, and to the influence of the CMC-content on the viscosity. This study gave rise to the development of a method, which followed that used by OYART (1953), but in ours the amount of the affection of the CMC was taken as a measure of the cellulolytic activity.

The method developed was applied to determine the cellulolytic activity of the rumen fluid of cows, with which during the winters of 1956—1957 and of 1957—1958 digestibility experiments were made. During the winter of 1956—1957 the feeding value of grass ensiled by the wilted method, and the feeding value of grass ensiled by the cold method with molasses, were compared (respectively group III and group IV, both consisting of 15 cows). At the control period I and II all the cows got the same roughage, namely grass ensiled without any preservative and grass ensiled with molasses respectively.

The figures for the affection of CMC showed a strong decrease in the cellulolytic activity in the first part of the experimental period for group IV. This decrease disappeared in the second part of the experimental period when 1 kg of straw was given per cow per day. A decrease of the cellulolytic activity was not observed during the control period II. There were no significant differences found for group III during the different periods.

The preliminary results as to the fat content of the milk during the digestibility experiments 1956—1957, showed a decrease during the experimental period for the cows of group IV. Any influence of the extra feeding with straw was not found. During the control period II there was also a decrease of the fat content of the milk. The cows of group III showed only a decrease in the fat content of the milk in the control period II. So there was not a good concurrence between the decrease of the fat content of the milk and the affection of the CMC.

In the digestibility experiment that was made in the winter of 1957—1958, the cows were divided into six groups of five animals per group (group I—group VI). During the experimental period two groups received the same roughage, namely the groups I and VI "molasses-silage", the groups II and V "molasses-silage" with hay, and the groups III and IV hay. During the experimental period the cows of the groups IV, V and VI got 4,7% extra fat in the concentrates. In the control period I and in the control period II the cows received the same concentrates (fat content 3,4%), and for roughage respectively grass ensiled by the wilted method and hay, and grass ensiled by the cold method with molasses as preservative and hay.

Taking into account the number of the measurements for the affection of the CMC,

the feeding of the extra fat did not influence this affection. To determine the influence of the roughage on the affection of the CMC, groups I and VI, groups II and V and groups III and IV were taken together. Taking into account the number of the measurements, only significant differences between the affection of the CMC in the experimental period and in the control period II were found.

The preliminary results of the digestibility experiment 1957—1958 showed no increase of the fat content of the milk after extra fat in the concentrates was given. No increase of the fat content of the milk in the control period II was found.

LITERATUUR

- BURROUGHS, W., P. GERLAUGH and R. M. BETHKE, The influence of alfalfa hay and fractions of alfalfa hay upon the digestion of ground corncobs. *J. Animal Sci.* 9 (1950) 207.
- CASON, J. L. and W. E. THOMAS, Cellulolytic activity of bovine rumen liquid upon a soluble cellulose derivate. *J. Dairy Sci.* 38 (1955) 608.
- CHENG, E. W., G. HALL and W. BURROUGHS, A method for the study of cellulose digestion by washed suspensions of rumen microorganisms. *J. Dairy Sci.* 38 (1955) 1225.
- FISHER, R. A., Statistical methods for research workers, 12th ed. Oliver and Boyd, London, 1954.
- FRENS, A. M. en K. STOLK, De invloed van het ruwvoederrantsoen op het celluloseafbrekend vermogen van de pensflora in een kunstpens. *Versl. Landbouwk. Onderz.* 63. 2 (1957).
- HERSHBERGER, T. V., O. G. BENTLEY and A. L. MOXON, A rapid volumetric method for the determination of cellulose in studies with rumen microorganisms in vitro. *J. Animal Sci.* 14 (1955) 725.
- HÖPPLER, F., Der exzentrische Fall von Kugeln in Hohlzylindern mit Flüssigkeiten oder Gasen. *Z. tech. Physik* 4 (1933) 165.
- HUHTANEN, C. N., R. K. SAUNDERS and L. S. GALL, Fiber digestion using the miniature artificial rumen. *J. Dairy Sci.* 37 (1954) 328.
- OYART, W., Chemische veranderingen in de voormagen der herkauwers. *Verh. Vlaamse Acad. Geneesk. België* 15 (1953) 435.
- STOLK, K., Vergelijkende cellulose-bepalingen. *Chem. Weekblad* 52 (1956) 682.
- ZORITA, E. und M. L. CALVO DE ZORITA, Über den Einfluss eines Antibiotikums auf die Pansenmikroorganismen und die bakterielle Zersetzung der Zellulose im Pansen („in vitro“). *Tierernähr. und Futtermittelk.* 11 (1956) 370.