



Rapport 221

Fermentatiekarakteristieken van veevoedergrondstoffen en een speenvoer

Augustus 2001



Colofon

Uitgever

Praktijkonderzoek Veehouderij
Postbus 2176, 8203 AD Lelystad
Telefoon 0320 - 293 211
Fax 0320 - 241 584
E-mail info@pv.agro.nl.
Internet <http://www.pv.wageningen-ur.nl>

Redactie en fotografie

Praktijkonderzoek Veehouderij

© Praktijkonderzoek Veehouderij

Het is verboden zonder schriftelijke toestemming van de uitgever deze uitgave of delen van deze uitgave te kopiëren, te vermenigvuldigen, digitaal om te zetten of op een andere wijze beschikbaar te stellen.

Aansprakelijkheid

Het Praktijkonderzoek Veehouderij aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Bestellen

ISSN 0169-3689
Eerste druk 2001/oplage 250
Prijs € 17,50 (f 38,56)

Losse nummers zijn schriftelijk, telefonisch, per e-mail of via de website te bestellen bij de uitgever.



Rapport 221

Fermentatiekarakteristieken van veevoedergrondstoffen en een speenvoer

E.M.A.M. Bruininx
P.G. van Wikselaar*
S.J.W.H. Oude Elferink*

* werkzaam bij ID TNO te Lelystad

Augustus 2001

Samenvatting

Het gebruik van antimicrobiële groeibevorderaars (AMGB's) in diervoeders staat vanwege de relaties met het ontstaan van resistentie bij -voor de mens- pathogene bacteriën sterk onder druk. Om het huidige productie- en diergezondheidsniveau zonder AMGB's te waarborgen is binnen de varkenshouderij een grote behoefte aan alternatieven voor deze AMGB's. Een mogelijk alternatief is het gebruik van gefermenteerd voer of gefermenteerde grondstoffen. Fermentatie is een complex proces dat sterk afhankelijk is van het aanwezige substraat, pH, temperatuur en soort micro organismen. Voordat het gebruik van gefermenteerd voer/grondstoffen op praktijkschaal kan worden getest als alternatief voor AMGB's in varkensvoeders, is het belangrijk om inzicht te hebben in de fermentatiekarakteristieken (chemisch en microbiologisch) van verscheidene veevoedergrondstoffen. In dit onderzoek is tijdens 14 dagen het verloop van de fermentatie van tarwe, tarwegries, sojaschroot en een compleet speenvoer bestudeerd. De keuze van deze grondstoffen is gebaseerd op de samenstelling. Er is gekozen voor een koolhydraatrijke, een VOOS- (verteerbare overige organische stof) rijke en een eiwitrijke grondstof. Tarwe is een zetmeelrijke grondstof. Tarwegries is relatief eiwit en zetmeel arm en rijk aan fermenteerbare niet-zetmeel koolhydraten. Sojaschroot is een eiwitrijke grondstof. Een compleet speenvoer bevat zowel eiwit als zetmeel. Tevens is het fermentatieverloop bestudeerd van tarwe waaraan 2,5 g/kg mierenzuur is toegevoegd, omdat van mierenzuur bekend is dat het de ontwikkeling van gisten remt. Het experiment bestond uit twee fasen. In de eerste fase van 48 uren kreeg een mengsel van 5 kg grondstof en 11 kg water de tijd om spontaan te fermenteren. Daarna (=tweede fase) is 10% van deze hoeveelheid gebruikt als entmedium voor 14,4 kg verse brij (=overenting). In totaal is er 12 keer overgeënt met een interval van 24 uren. Deze werkwijze is gekozen omdat fermentatie in de praktijk ook een batch proces zal zijn, waarbij een deel aan de dieren wordt verstrekt en een deel wordt gebruikt ter versnelling van de fermentatie van de nieuwe verse batch. Tijdens de fermentatie van de eerste batch en tijdens het proces van overenten zijn op vaste tijden monsters genomen die geanalyseerd zijn op pH, fermentatieproducten (melk-, azijn- propion- en boterzuur en alcoholen), enterobacteriën, gisten en schimmels. De belangrijkste resultaten en conclusies zijn:

- Door een te hoge pH van de sojaschroot (na 48 uren fermenteren én na overenten; pH 5) kan de ontwikkeling van schadelijke organismen (*E. coli*, *Salmonella*) niet worden uitgesloten. Daarom is sojaschroot voor de praktijk geen geschikt substraat voor een spontane melkzuurfermentatie.
- Door een snelle daling van de pH (zowel in de startbatch als na overenten ≤ 4) in tarwe en tarwegries lijken beide grondstoffen een geschikt fermentatiesubstraat. Bij het gebruik van met name tarwegries moet echter rekening gehouden worden met enige activiteit van enterobacteriën (zoals *E. coli*) en met een snelle toename van het aantal gisten. Nader onderzoek gaf aan dat de ontwikkeling van gisten (bij alle grondstoffen) waarschijnlijk beter onder controle gehouden kan worden door het regelmatig verwijderen van de toplaag van de brij.
- De pH van compleet speenvoer daalt bij inzet tot de gewenste pH 4. Deze pH wordt echter pas 48 na inzet bereikt. Ook 24 uren na elke overenting is de pH lager dan 4. Ondanks dat de pH op het gewenste niveau lag, waren er aanwijzingen voor enige mate van enterobacteriële activiteit in het complete speenvoer. De gehalten aan de aminozuren methionine en cysteine (per kg droge stof) veranderen niet. Dit onderzoek heeft geen duidelijke aanwijzingen opgeleverd dat het complete speenvoer niet geschikt is als fermentatiesubstraat. Buitenlands onderzoek geeft aan dat afbraak van eiwit en aminozuren (met name lysine) bij fermentatie van complete voeders niet kan worden uitgesloten. Daarom lijkt het gebruik van een compleet speenvoer als fermentatiesubstraat niet gewenst.
- De toevoeging van 2,5 g/kg 80%-ige mierenzuur aan tarwe ter beheersing van de hoeveelheid gisten lijkt een averechts effect te hebben. De toevoeging van mierenzuur heeft een constante

pH van ± 4 tot gevolg. Door deze direct lage pH wordt echter geen melkzuur gevormd waardoor gisten niet hoeven te concurreren met melkzuurbacteriën om de aanwezig suikers. Waarschijnlijk door een ophoping van gisten door het overenten breken de gisten door de zuurbarrière heen. Hierbij treedt een aanzienlijk verlies van substraat op en wordt veel ethanol gevormd.

- Er is geen duidelijk maximum vast te stellen voor het aantal keren dat men kan overenten zonder dat er bederf optreedt. Voor de praktijk is het raadzaam om toch regelmatig te stoppen met overenten en te beginnen met een nieuwe startbatch (wekelijks?). De gistconcentraties op de bodem van het fermentatievat lijken als richtlijn hiervoor in aanmerking te komen. Het ontbreekt op dit moment nog aan een snelle analysemethode en een grenswaarde voor het aantal gisten. In de praktijk wordt gestreefd naar concentraties lager dan 100.000 kve/g.

Summary

Because of associations between resistance among bacteria which are pathogenic for humans and the use of anti-microbial growth promoters (AMGP's) in animal feeds, the use of AMGP's is under discussion. Expecting a total ban on all AMGP's in the near future, the pig industry is searching for new feed concepts that may serve as alternatives. The use of fermented feedstuffs/feeds seems to be a promising alternative. However, fermentation is a dynamic and complex process that strongly depends on the presence and type of substrate, pH, temperature, and the presence and type of microorganisms. Before the inclusion of fermented feed stuffs can be tested in pig diets, more information on fermentation characteristics (chemical and microbiological) is needed. In the present experiment the fermentation characteristics of wheat, wheat middlings, extracted soybeans and a complete weaner diet were studied during a 14 day period. These feedstuffs were selected on the basis of their composition. Wheat represented the feedstuffs rich in digestible carbohydrates (starch and sugars). Wheat middlings represented the feed stuffs rich in fermentable non starch polysaccharides (NSP). Extracted soybeans represented the protein rich feedstuffs while the complete weaner diet is high in digestible carbohydrates and protein. Because formic acid is known to slow the development of yeasts, the fermentation characteristics of wheat plus 2.5 g/kg formic acid were also studied. The experiment consisted of two phases. During phase 1 a mixture (=starting batch) of 5 kg of each feedstuff and 11 kg water (water:feed = 2.2 : 1) was given 48 hours to ferment spontaneously. After these 48 hours 1.6 kg (= 10%) of each start batch was used as an inoculate for 14.4 kg of the second batch of each feedstuff (phase 2). This technique of inoculation was repeated 12 times with an interval of 24 hours between two consecutive inoculations. Inoculation was used to accelerate fermentation. During both phase 1 and 2, samples of all feedstuffs were taken and analysed on pH, fermentation products (lactic-, citric, and propionic acid, ethanol), enterobacteria, yeasts and moulds. The most important results and conclusions of this experiment are:

- Due to high pH-level (pH 5 during phase 1 and 2), the risk of contamination of extracted soybeans with coliform bacteria and Salmonella can not be excluded. Therefore, extracted soybeans are not a suitable substrate for spontaneous lactic acid fermentation
- Because of a quick drop in pH (phase 1 and 2 \leq 4) wheat and wheat middlings seem to be suitable fermentation substrates. However, when using wheat middlings some activity of enterobacteria (including coliforms) as well as a rapid increase of yeast numbers could occur. Additional research suggested that the development of yeasts during the fermentation of wheat middlings (and other feed stuffs) is more controllable by occasionally removing the top layer of the wet feedstuff before it is used as an inoculate.
- Although slower than for wheat and wheat middlings, the pH of the complete weaner diet also reached pH 4 during phase 1 and 2. Despite this low pH there was some indication of enterobacterial activity in the complete weaner diet. The amounts of the amino acids cystine and methionine in the extracted soybeans and in the weaned diet were not affected during the fermentation process (on a dry matter basis). Lysine was not measured. Apart from the enterobacterial activity, this experiment gave no clues for the rejection of a complete weaner diet as a substrate for spontaneous lactic acid fermentation. However, in literature a considerable degradation of proteins and especially synthetic amino acids during fermentation is reported. Therefore, the use of a complete weaner diet as a fermentation substrate seems not advisable.

- The addition of formic acid (2.5 g of a 80% solution per kg) to control the development of yeasts has the opposite effect. Formic acid resulted in a constant pH of approximately 4 during both phase 1 and 2. Lactic acid could not be detected in wheat with formic acid. This suggests a low activity of the lactic acid bacteria. Therefore, it seems likely that the yeast did not have to compete for sugars with the lactic acid bacteria. Probably due to this lack of competition and by the process of inoculation the yeast numbers in wheat plus formic acid were able to increase considerably.
- There doesn't seem to be a clear limit to the number of inoculations that can be performed without disturbing the process of lactic acid fermentation. However, for practical purposes it seems advisable to stop inoculation on a regular, perhaps weekly basis and to restart the process with a fresh batch in a clean environment. The concentration of yeast at the bottom of the fermentation tank may be used as an indicator for the right moment to restart the process. However, a fast technique for analysing yeast numbers is lacking. Furthermore, although in practice a yeast concentration below 100.000 cfu/g is aimed for, the optimum cut-off point has not yet been determined.

Inhoudsopgave

Samenvatting

Summary

1	Inleiding	1
2	Materiaal en methode	3
2.1	Analyses.....	3
2.1.1	Chemische analyses.....	4
2.1.2	Microbiologische analyses.....	4
2.2	Verzameling en verwerking van de gegevens.....	4
3	Resultaten	5
3.1	Fermentatiekarakteristieken batch 1.....	5
3.2	Fermentatiekarakteristieken gedurende een periode van overenten.....	7
3.3	Microbiologische kenmerken.....	9
3.4	Fermentatieproducten.....	14
4	Conclusies	17
	Literatuur	22
	Bijlagen	24
Bijlage 1	Berekende grondstoffensamenstelling en chemische samenstelling van het speenvoer (g/kg).....	24
Bijlage 2	Verloop van het melkzuurgehalte per herhaling.....	25
Bijlage 3	Verloop van het azijnzuurgehalte per herhaling.....	26
Bijlage 4	Verloop van het ethanolgehalte per herhaling.....	27
Bijlage 5	Gehalte aan cystine in sojaschroot en speenvoer bij inzet en 24, 96 (sojaschroot) en 168 (speenvoer) uren na de twaalfde overenting.....	28
Bijlage 6	Gehalte aan methionine in sojaschroot en speenvoer bij inzet en 24, 96 (sojaschroot) en 168 (speenvoer) uren na de twaalfde overenting.....	29

1 Inleiding

Het gebruik van antimicrobiële groeibevorderaars (AMGB's) in diervoeders staat vanwege de relaties met het ontstaan van resistentie bij -voor de mens- pathogene bacteriën sterk onder druk. Anderzijds heeft het gebruik van AMGB's sterk bijgedragen aan een efficiënte dierlijke productie. Het is niet ondenkbaar dat het gebruik van AMGB's in diervoeders niet meer is toegestaan. Om het huidige productie- maar zeker ook diergezondheidsniveau te waarborgen is binnen de varkenshouderij grote behoefte aan alternatieven voor deze AMGB's.

Scholten et al. (1999) suggereren mogelijkheden voor het gebruik van gefermenteerd voer ter voorkoming van maagdarfstoornissen bij biggen. Voorlopige resultaten van Scholten et al. (in voorbereiding) wijzen op een positief effect van het voeren van gefermenteerde tarwe op de darmmorfologie (villushoogte en crypte diepte) van gespeende biggen in vergelijking met het voeren van niet gefermenteerde tarwe. In laatst genoemd onderzoek is gekozen voor fermentatie van tarwemeel omdat deze grondstof aanzienlijke hoeveelheden zetmeel bevat waardoor het fermentatieproces vlot verloopt én omdat tarwemeel een constante samenstelling heeft in vergelijking met vochtrijke bijproducten. Eveneens is tarwe een belangrijke grondstof voor voeders voor alle leeftijdscategorieën varkens. Het is echter de vraag of tarwemeel de meest interessante grondstof is om te laten fermenteren. Mogelijk is het voor de praktische varkenshouderij interessanter om in plaats van zetmeelrijke, goed verteerbare grondstoffen, goedkopere grondstoffen met een lage(re) voederwaarde te laten fermenteren. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan grondstoffen met een relatief laag gehalte aan zetmeel, maar een relatief hoog gehalte aan fermenteerbare niet-zetmeel koolhydraten ofwel VOOS-rijke grondstoffen (verteerbare overige organische stof).

Fermentatie is een complex proces waarvan het verloop sterk afhankelijk is van ondermeer het aanwezige substraat, hoeveelheid en soort van micro-organismen, temperatuur en pH (Rijnen en Scholten, 1998). Bij de fermentatie van voer of voedermiddelen is een melkzuurfermentatie gewenst, omdat dit een smakelijk en goed geconserveerd eindproduct oplevert (Oude Elferink et al., 1999). Er moet rekening mee worden gehouden dat tijdens het fermentatieproces niet alleen gewenste maar ook ongewenste microbiële omzettingen kunnen plaatsvinden. Een goed inzicht in het fermentatieproces van specifieke grondstoffen/voeders is dus vereist voordat fermentatie door dierproeven wordt getest. Daarom is in dit onderzoek nagegaan of op basis van het verloop van het fermentatieproces (vorming van organische zuren, pH) het VOOS rijke tarwegries een geschikt fermentatiesubstraat is. Om meer inzicht te krijgen in de fermentatie van eiwitrijke substraten is eveneens het fermentatieproces van een compleet speenvoer (zonder AMGB's) en van sojaschroot bestudeerd. Scholten (mondelinge mededeling) veronderstelt dat de kans op eiwitafbraak groter is bij grondstoffen en complete voeders met een hoog eiwitgehalte dan bij grondstoffen met een laag eiwitgehalte. Een goede onderbouwing van deze veronderstelling ontbreekt tot op heden.

Aangezien in de praktijk het produceren en verstrekken van gefermenteerd voer een batchproces is (voor elke voerbeurt wordt een nieuwe portie aangemaakt), wordt dit ook in de huidige proef toegepast. Bovendien gebruiken we ter versnelling van de fermentatie een deel van de oude batch als entmedium voor de nieuwe batch (Scholten et al., in voorbereiding; Jensen and Mikkelsen, 1998; Geary et al, 1998). Door gebruik te maken van een entmedium met veel actieve melkzuurbacteriën wordt het verloop van de fermentatie al richting een melkzuurfermentatie gestuurd. Scholten et al. (in voorbereiding) vonden aanwijzingen dat deze werkwijze niet ongelimiteerd is, doordat na verloop van tijd ongewenste omzettingen een rol gaan spelen (met name vergisting). Daarom is eveneens bestudeerd vanaf welk moment dit bij de genoemde grondstoffen (tarwe, tarwegries, sojaschroot en een compleet speenvoer) een rol gaat spelen. Onderzoek van Oude elferink et al. (1999a) geeft aan dat gistvorming tijdens het fermentatieproces kan leiden tot een verlies aan voederwaarde. Tevens kunnen gisten het gewenste melkzuur

afbreken waardoor de pH stijgt en andere schadelijke microörganismen de kans krijgen zich te vermenigvuldigen (Oude Elferink et al., 1999a). Onderzoek met ruwvoersilages (Driehuis and Van Wikselaar, 1996) geeft aan dat mierenzuur de ontwikkeling van gisten remt. Daarom is in dit onderzoek tevens het fermentatieproces van tarwe met 2,5 g/kg mierenzuur bestudeerd.

Het doel van dit onderzoek is om op basis van de fermentatiekarakteristieken (chemische en microbiologische kenmerken) te beslissen welke grondstof(en) geschikt is/zijn als fermentatiesubstraat voor de praktische varkenshouderij. Tevens is nagegaan of overenting en de toevoeging van mierenzuur kunnen worden toegepast ter beheersing van het fermentatieproces.

2 Materiaal en methode

Proefopzet

Het experiment is uitgevoerd met tarwe, tarwe met toevoeging van een 80% mierenzuuroplossing (2,5 g/kg), tarwegries, sojaschroot en een compleet speenvoer zonder antibiotica, organische zuren en zonder extra koper en zink (zie bijlage 1). Deze producten zijn opgeslagen in afsluitbare kunststof vaten van 20 liter. Per grondstof zijn twee vaatjes tegelijkertijd ingezet. De ruimtetemperatuur gedurende het gehele experiment was 30° C (± 0,5°).

Op dag 0 is per vaatje 5 kg van een grondstof (in meelvorm) en 11 kg water (water : voer = 2,2 : 1) gedoseerd en gemengd. Een periode van 48 uren vanaf inzet van de eerste batch is verondersteld voldoende te zijn voor het bereiken van een stabiele pH. Deze eerste batch zal in het vervolg van het rapport aangeduid worden als "batch 1". Na 48 uren van fermentatie van batch 1, is 1,6 kg (= 10%) van de brij toegevoegd aan 14,4 kg verse brij in een water : voer verhouding van 2,2 : 1. Deze werkwijze wordt in het vervolg van dit rapport aangeduid met de term "overenting". Er is telkens om de 24 uur overgeënt. Voor elk product zijn per vaatje in totaal twaalf overentingen uitgevoerd. Het gebruikte water had een temperatuur van 30° C. Aangezien de droge grondstoffen en het speenvoer koel werden bewaard, leidde elke overenting tot een temperaturdaling.

Monsternames

Bij inzet van batch 1 (tijdstip 0) en vervolgens met intervallen van 6 uren zijn de pH van de brij gedurende een periode van 48 uren gemeten en de brij gewogen. Tevens is op deze tijdstippen een monster (± 15 gram) genomen van batch 1 en direct ingevroren (-20° C) ten behoeve van de chemische analyses. Bij inzet van batch 1 en 24 en 48 uren daarna én vervolgens 24 uur na de eerste, vierde, achtste en twaalfde overenting (respectievelijk batch 1, 2, 5, 9 en 13) werden monsters genomen die direct zijn ingezet voor microbiële analyses (telling van gisten, schimmels, melkzuurbacteriën, enterobacteriën en *Escherichia coli*). Voorafgaand aan elke monsternamen is de brij gedurende 1 minuut geroerd met een roerstaaf die bevestigd werd aan een boormachine. De roerstaaf was voorzien van vier verticale bladen. In de minst visceuze brijsoorten (tarwe en compleet speenvoer) werd een monster verkregen door een buis met een inhoud van ruim 15 ml onder te dompelen tot op de bodem van het vat. Vanwege het visceuze karakter van de sojaschrootbrij en tarwegriesbrij is van deze producten met een spatel telkens op verscheidene plaatsen in de vaten een monster genomen.

Direct na elke overenting en 24 uur daarna (= vlak voor de volgende overenting) is de brij gewogen, de pH gemeten en zijn monsters genomen die direct zijn ingevroren (-20° C) voor de chemische analyses. De chemische analyses zijn uitgevoerd in de startbatch (24 uren na inzet) en 24 uren na de vierde en twaalfde overenting.

2.1 Analyses

Voorafgaand aan de chemische en microbiologische analyses is van de monsters exact 15 gram afgewogen. Hierbij is exact 135 gram gedemineraliseerd water toegevoegd. Deze mengsels zijn vervolgens 5 minuten gehomogeniseerd. Voor de microbiologische analyses (telling van melkzuurbacteriën, enterobacteriën, *E. coli* bacteriën, gisten en schimmels) zijn van deze homogenaten decimale verdunningen gemaakt met de verdunningsvloeistof EST (1,0 g/l pepton en 8,5 g/l NaCl). Voor de chemische analyses (vluchtige vetzuren, melkzuur en alcoholen) zijn de homogenaten 20 minuten gecentrifugeerd (5000 x G). Vervolgens is per 5 ml supernatant 1 ml H₃PO₄ (5% w/v) toegevoegd. Deze geconserveerde supernatanten zijn tot het moment van analyse ingevroren (-20° C).

2.1.1 Chemische analyses

De zuurgraad werd na het mengen (1 minuut) direct in de vaten met brij gemeten. Het verlies aan brij werd gemeten door de vaten regelmatig te wegen. De concentraties aan melkzuur, mierenzuur, vluchtige vetzuren (azijnzuur, propionzuur, boterzuur) en alcoholen (ethanol, butanol, 1-propanol, 1,2-propaandiol, 2,3-butaandiol) in de geconserveerde supernatanten zijn gemeten met behulp van High Performance Liquid Chromatografie (HPLC) met een Polyspher OA HY 51272 kolom, een kolomtemperatuur van 45° C en een eluent van 0,0025 M H₂SO₄. De flow rate bedroeg 0,5 ml/min. Bij inzet van de startbatch en 24, 96 en 168 uren na de laatste (= twaalfde overenting) zijn monsters van sojaschroot en het speenvoer genomen en geanalyseerd op het gehalte aan methionine en cystine.

2.1.2 Microbiologische analyses

Alle microbiologische analyses zijn gedaan met behulp van telplaten, voorzien van een specifieke voedingsbodem. Daarvoor zijn eerst van de brijmonsters verdunningsreeksen gemaakt die vervolgens zijn geënt op de platen. De kleinste verdunning waarbij bacteriekolonies nog duidelijk te onderscheiden waren is gebruikt om deze kolonies (kolonie vormende eenheden; KVE) te tellen. Deze aantallen KVE zijn teruggerekend naar aantallen KVE per gram brij waarna een transformatie naar logaritme (¹⁰Log) eenheden plaatsvond.

Melkzuurbacteriën

Melkzuurbacteriën zijn geteld op dubbellaagse gietplaten met Rogosa SL Agar (Difco) met een pH van 6,2 en met 10 ml/l 1 M NaOH en 100 mg/l cycloheximide (Sigma) na een incubatie van 3 dagen bij 30° C (Reuter, 1985).

Enterobacteriën

Enterobacteriën zijn geteld op dubbellaagse gietplaten met Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid) na een incubatie van 24 uren bij 30° C.

Escherichia coli bacteriën

Escherichia coli bacteriën zijn geteld op strijkplaten met McConckey Agar (Oxoid), na een incubatie van 24 uren bij 44° C.

Gisten

Gisten zijn geteld op dubbellaagse gietplaten met Malt Extract Agar (Oxoid) aangezuurd met melkzuur tot een pH van 3,5, na een incubatie van 3 dagen bij 30° C.

Schimmels

Schimmels zijn geteld op strijkplaten met Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (Oxoid), na een incubatie van 3 dagen bij 30° C. Op deze strijkplaten kunnen ook gisten groeien. Indien bij een bepaalde verdunning de telplaat vol gegroeid was met gisten, kon geen nauwkeurige telling van de schimmels uitgevoerd worden. Wel konden we een bovengrens aan het aantal schimmels stellen.

2.2 Verzameling en verwerking van de gegevens

De gerapporteerde analyseresultaten zijn telkens gemiddelden van de twee vaatjes per grondstof. Aangezien per grondstof en per moment slechts twee waarnemingen zijn gedaan, is een statistische analyse niet zinvol. De resultaten van beide herhalingen zijn voor de gehalten aan melkzuur, azijnzuur en ethanol in bijlage 2, 3 en 4 weergegeven.

3 Resultaten

Allereerst worden het verloop van de zuurgraad en van het gewichtsverlies gedurende de eerste 48 uren na de inzet van batch 1 behandeld. Daarna gaan we in op het verloop van deze kenmerken gedurende het traject van 12 keer overenten (= batch 2 tot en met batch 13).

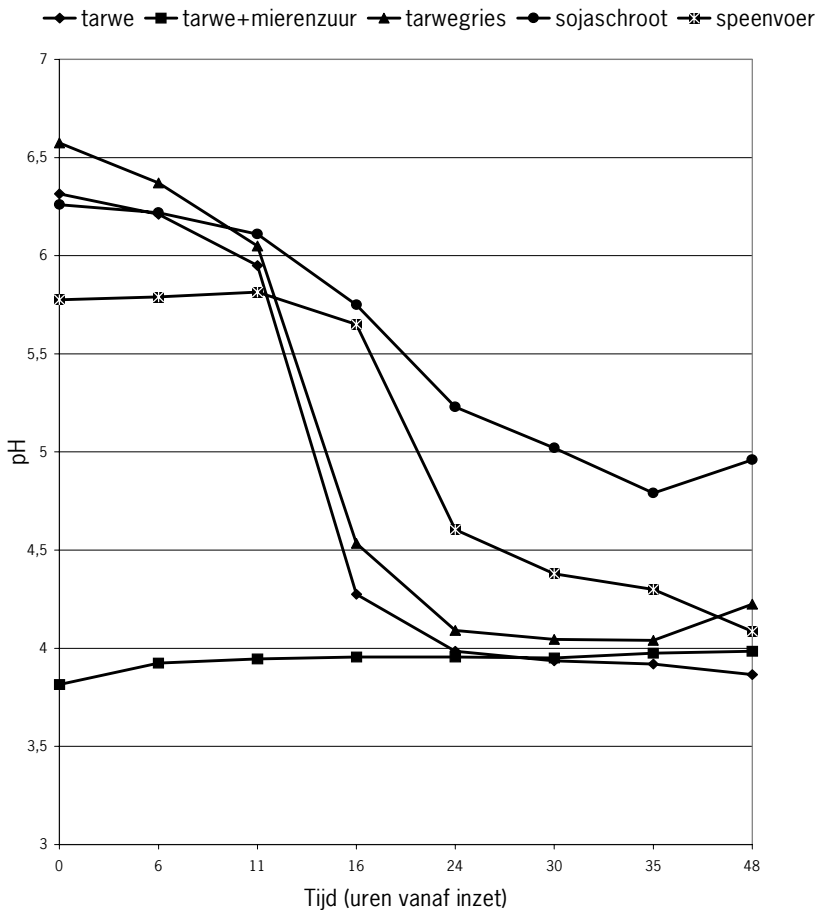
Tot slot worden de microbiële kenmerken (telling van gisten, schimmels en bacteriën alsmede de aanwezigheid van fermentatieproducten) voor zowel batch 1 als de overige batches integraal behandeld.

3.1 Fermentatiekarakteristieken batch 1

Zuurgraad

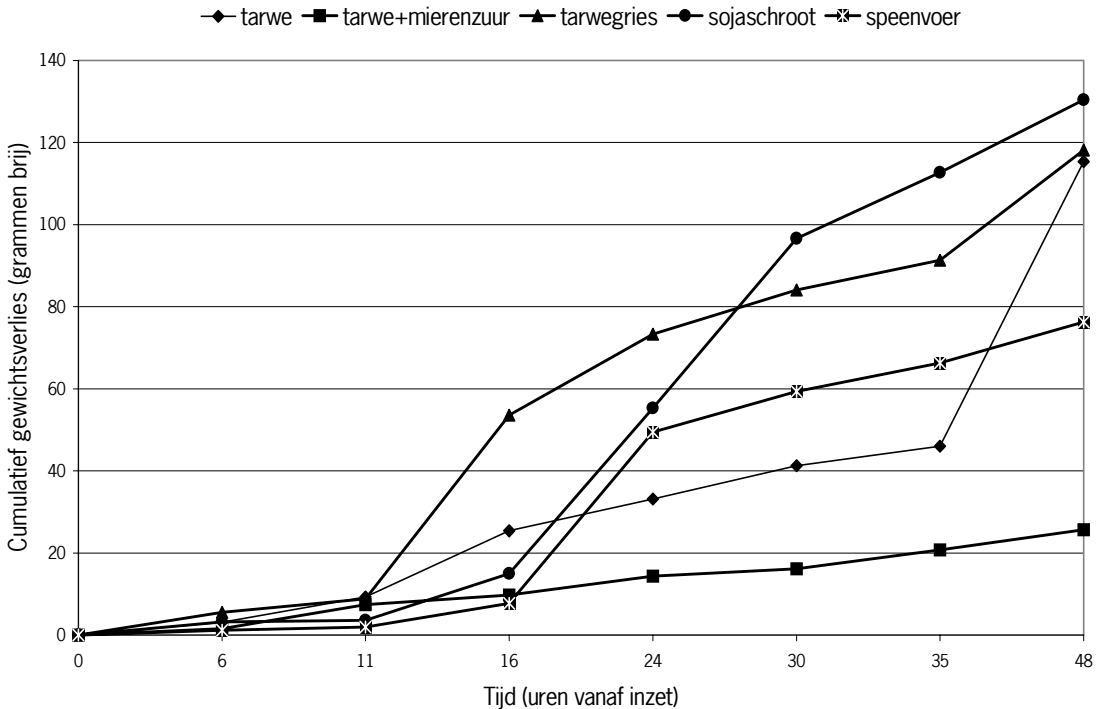
In figuur 1 is het verloop van de zuurgraad van batch 1 (= startbatch) gedurende de eerste 48 uren vanaf inzet weergegeven. Hieruit blijkt dat, afgezien van de tarwe met mierenzuur waar de begin pH al laag is, in alle producten een duidelijke daling van de pH plaats vond. Het verloop van de pH van tarwegries was vrijwel identiek aan het verloop van de pH van tarwe. Beide grondstoffen bereikten binnen 24 uren na inzet een pH van ongeveer 4. De pH van tarwegries begon na 36 uren weer wat te stijgen in beide vaatjes. De pH van tarwe daarentegen was na 48 uren nog 3,9.

De begin pH van sojaschroot (pH = 6,3) was vergelijkbaar met die van tarwe. De daling in de pH van sojaschroot was echter trager dan die van tarwe. De minimum pH van sojaschroot was 4,8. Deze waarde is hoger dan de minimumwaarde voor tarwe (3,9). Evenals bij tarwegries liep de pH van sojaschroot vanaf 36 uren weer wat op. Ook dit vond plaats in beide vaatjes. De fermentatie van het complete speenvoer begon op een pH van 5,8. Dit zakte binnen 48 uren naar een waarde van 4,1. Vanaf 18 uren na inzet was de daling van de pH van het complete speenvoer pas duidelijk waarneembaar. De pH van tarwe met mierenzuur bleef gedurende de eerste 48 uren vrijwel constant (3,9 à 4).

Figuur 1 Verloop van de pH van de startbatches gedurende 48 uren na inzet**Gewichtsverlies**

In figuur 2 is het verloop van het cumulatieve gewichtsverlies gedurende de eerste 48 uren na inzet van batch 1 weergegeven. Hieruit blijkt dat de ontwikkeling van het gewichtsverlies vanaf 11 uren na inzet van batch 1 duidelijk begon te verschillen. Het gewichtsverlies na 48 uren was bij tarwe + mierenzuur duidelijk het laagst ($\approx 0,15\%$), en van sojaschroot het hoogst ($\approx 0,77\%$). Het gewichtsverlies van tarwegries kwam al vroeg op gang, terwijl 60% van het totale verlies van tarwe pas gerealiseerd werd in de periode van 35 tot 48 uren na inzet.

Figuur 2 Verloop van het cumulatief gewichtsverlies van de startbatches gedurende 48 uren na inzet



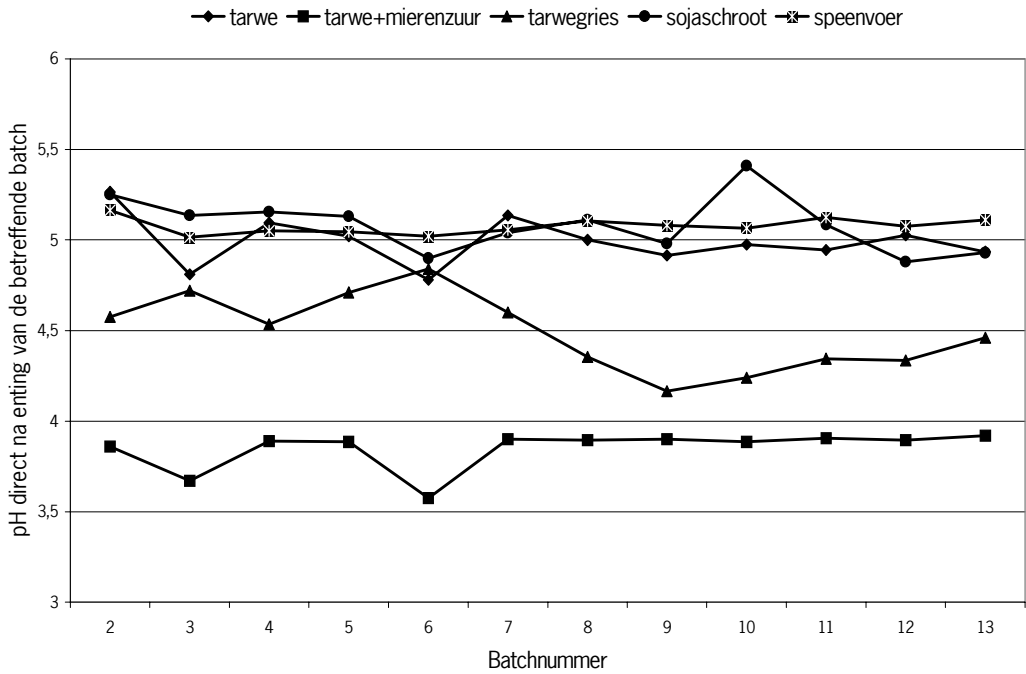
3.2 Fermentatiekarakteristieken gedurende een periode van overenten

Zuurgraad direct na overenten en 24 uren later

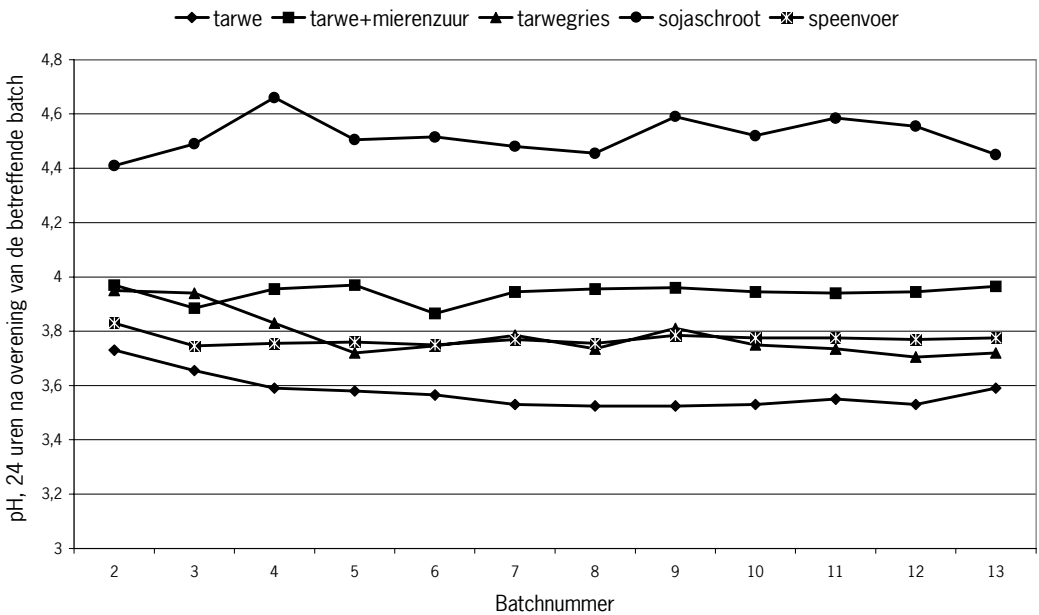
In figuur 3 is het verloop weergegeven van de pH-waardes vlak na elke overenting, in figuur 4 het verloop van de pH-waardes 24 uur na elke overenting. Uit figuur 3 blijkt dat de pH van tarwe, sojaschroot en het compleet speenvoer vlak na elke overenting (=begin pH) vrij consequent rondom een waarde van 5 lag. De begin pH van tarwegries vertoonde een wat grotere bandbreedte rondom een waarde van 4,5. De begin pH van batch 2 t/m 7 van tarwegries was hoger dan 4,5. Vanaf batch 8 lag de begin pH van tarwegries onder 4,5. Gedurende de eerste zes overentingen vertoonde de begin pH van tarwe met mierenzuur een wat grillig verloop ten opzichte van de begin pH van batch 7 tot en met 13 (stabiel op 3,9).

De pH-waardes 24 uren na elke overenting (=eind pH; figuur 4) vertonen voor alle grondstoffen een vrij constant verloop met het toenemen van het aantal keren dat is overgeënt. De eind pH van sojaschroot is in vergelijking met de overige vier grondstoffen hoog. Afgezien van de stijging van de eind pH tijdens de eerste drie overentingen (= batch 2 tot en met 4) is het verloop van de eind pH met het toenemen van het aantal keren dat is overgeënt vrij constant ($\approx 4,5$). De eind pH van de overige grondstoffen was telkens lager dan 4. De laagste eind pH werd telkens bereikt door tarwe ($\approx 3,6$).

Figuur 3 Verloop van de begin pH van iedere batch (direct na elke overenting)



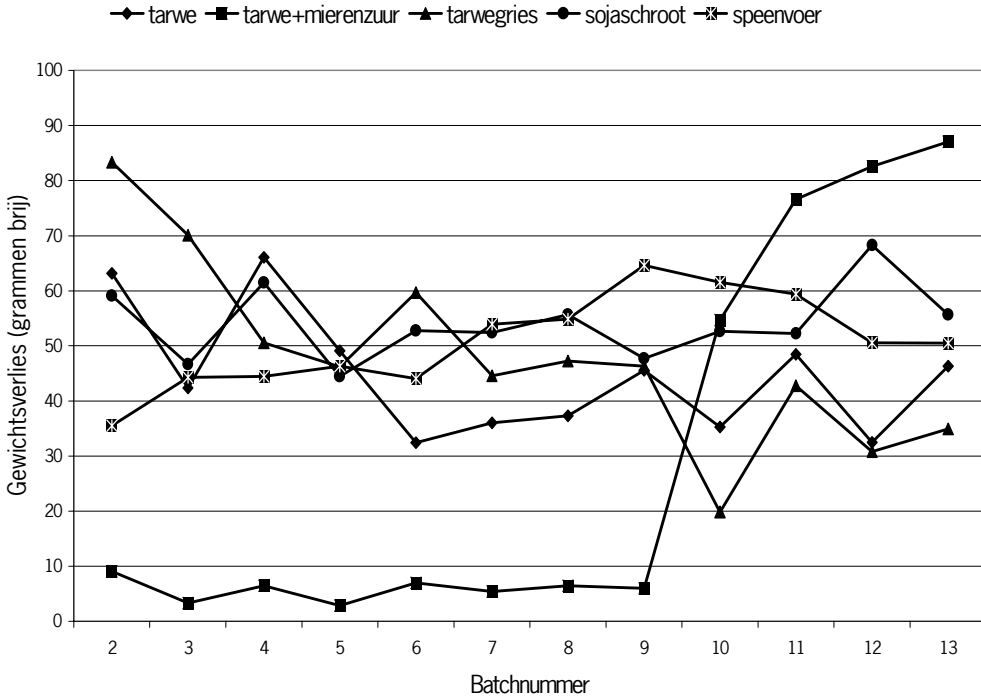
Figuur 4 Verloop van de eind pH van iedere batch (vlak voor de volgende overenting)



Gewichtsverlies: 24 uren na overenten t.o.v. direct na overenten

In figuur 5 is het verloop van het gewichtsverlies (24 uren na overenten - direct na overenten) in batch 2 tot en met batch 13 weergegeven.

Figuur 5 Verloop van het gewichtsverlies (24 uren na overenten - direct na overenten) in batch 2 tot en met 13

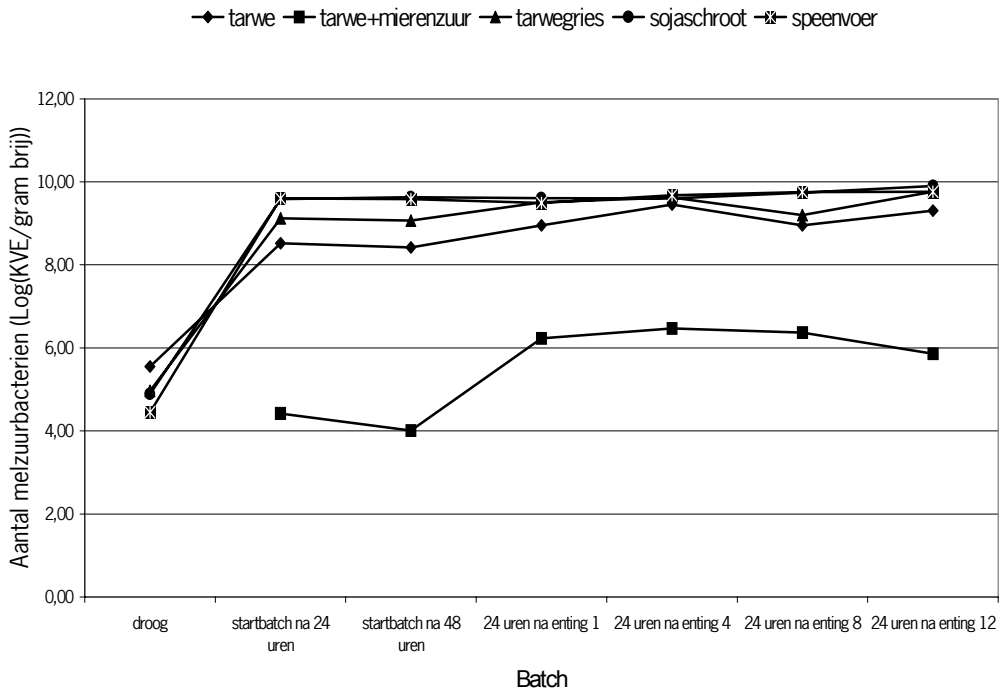


Uit figuur 5 blijkt dat gedurende het traject van overenten het gemiddelde gewichtsverlies van met name tarwe, tarwegries, sojaschroot en het complete speenvoer een grillig verloop vertoonde. Het maximale gewichtsverlies bij tarwe en tarwegries trad al vrij vroeg op (66,0 en 83,3 gram in respectievelijk batch 4 en batch 2), terwijl het maximale gewichtsverlies in sojaschroot en speenvoer na respectievelijk elf (= batch 12: 68,3 gram) en acht (= batch 9: 64,6 gram) keer overenten optrad. Het gemiddelde gewichtsverlies in tarwe + mierenzuur was tot en met batch 9 vrijwel constant (8-9 gram) waarna het vervolgens snel toenam tot 87,1 gram in batch 13.

3.3 Microbiologische kenmerken

Melkzuurbacteriën

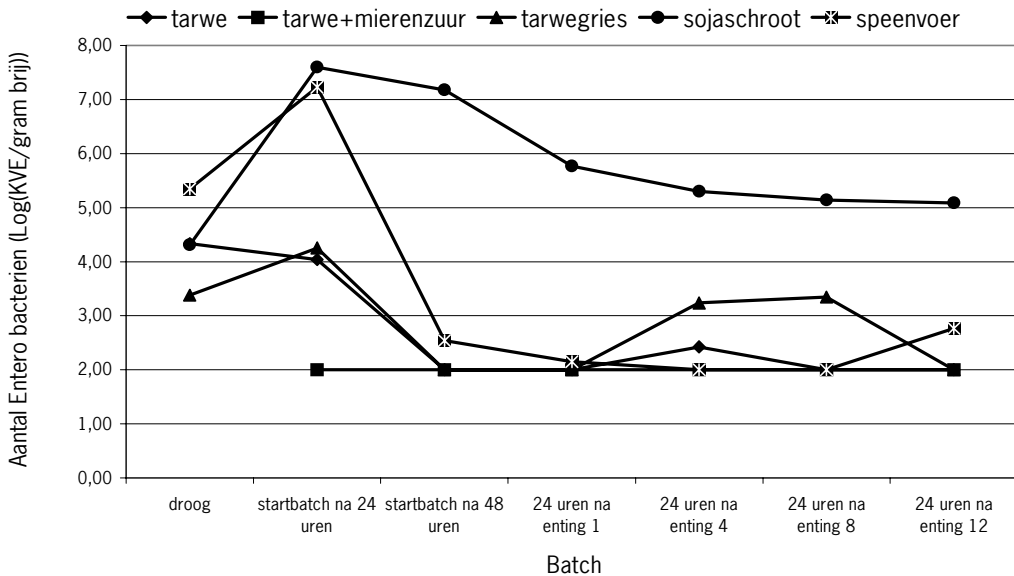
In figuur 6 is de ontwikkeling van het aantal melkzuurbacteriën in de vijf producten weergegeven.

Figuur 6 Verloop van het aantal melkzuurbacteriën

Uit figuur 6 blijkt dat, met uitzondering van tarwe + mierenzuur, gedurende de eerste 24 uren na de inzet van de startbatches het aantal melkzuurbacteriën in alle producten aanzienlijk is toegenomen ten opzichte van het aantal melkzuurbacteriën in de droge producten (ongeveer vier log-eenheden hoger wat overeenkomt met een factor 10.000). Vervolgens bleef het aantal melkzuurbacteriën op 48 uren na inzet en 24 uren na elke overenting redelijk constant in deze vier producten. In tarwe + mierenzuur konden bij inzet geen melkzuurbacteriën worden aangetoond. Op 24 en 48 uren na inzet van de startbatch was het aantal melkzuurbacteriën in tarwe + mierenzuur ongeveer 1×10^4 kve/gram. Vanaf 24 uren na de eerste overenting was het aantal melkzuurbacteriën in tarwe + mierenzuur ongeveer 1×10^6 kve/gram en daarmee ongeveer een factor 1000 lager dan in de overige vier producten.

Enterobacteriën

In figuur 7 is de ontwikkeling van het totale aantal enterobacteriën in de vijf producten weergegeven. *Escherichia coli* (*E. coli*) behoort tot de groep van enterobacteriën. Figuur 8 geeft de ontwikkeling van het aantal *E. coli* in de vijf producten weer.

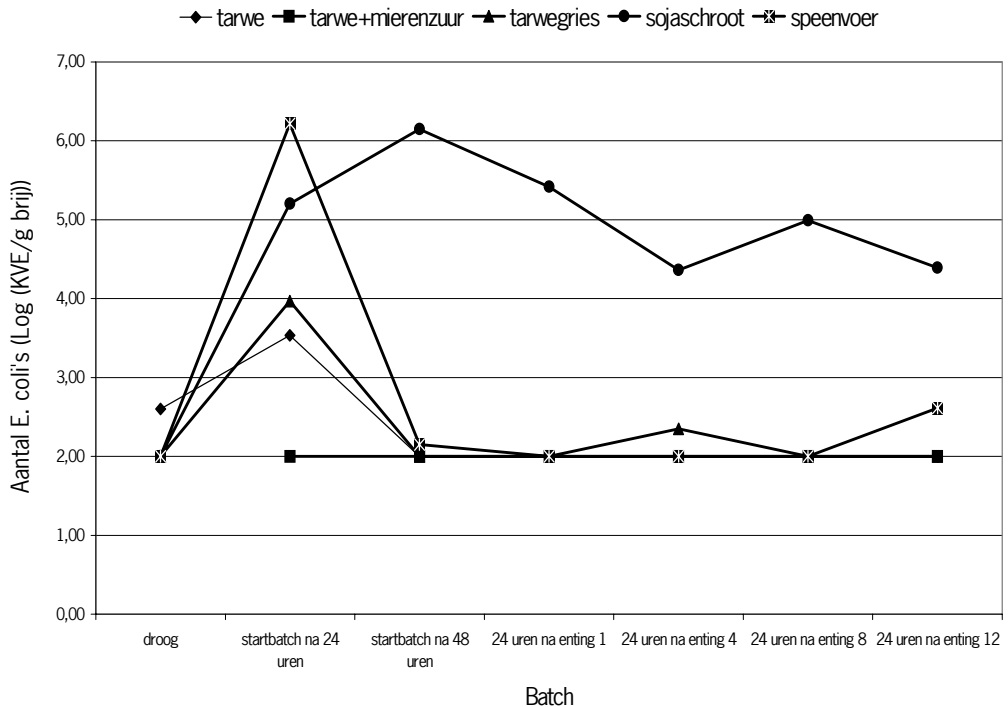
Figuur 7 Verloop van het aantal enterobacteriën

Uit figuur 7 blijkt dat gedurende de eerste 24 uren na inzet van de startbatch er een toename was van het aantal enterobacteriën in tarwegries, sojaschroot en het complete speenvoer. Na 48 uren is dat aantal in het complete speenvoer en in de tarwegries weer aanmerkelijk afgenomen. Het aantal enterobacteriën in het complete speenvoer blijft vervolgens tot aan de achtste overenting constant op een niveau van 1×10^2 kve/gram. Na de twaalfde overenting is het aantal enterobacteriën in het complete speenvoer weer iets gestegen. Tussen de eerste en de achtste overenting neemt het aantal enterobacteriën in tarwegries toe, terwijl het na de twaalfde overenting weer is gedaald tot 1×10^2 kve/gram. Ook het aantal enterobacteriën in sojaschroot neemt af vanaf 24 uren na inzet van de startbatch. Deze afname verloopt echt minder snel dan in de overige producten en stabiliseert uiteindelijk ook op een hogere waarde (ongeveer 1×10^5 kve/gram). Het aantal enterobacteriën in tarwe neemt direct vanaf inzet van de startbatch af tot een niveau van 1×10^2 kve/gram 48 uren na inzet. Dit niveau blijft gehandhaafd met twee kleine verhogingen na overentingen 4 en 12.

Bij inzet van tarwe + mierenzuur konden geen enterobacteriën worden aangetoond. Daarna lag het aantal enterobacteriën in tarwe + mierenzuur constant op 1×10^2 kve/gram.

E. Coli

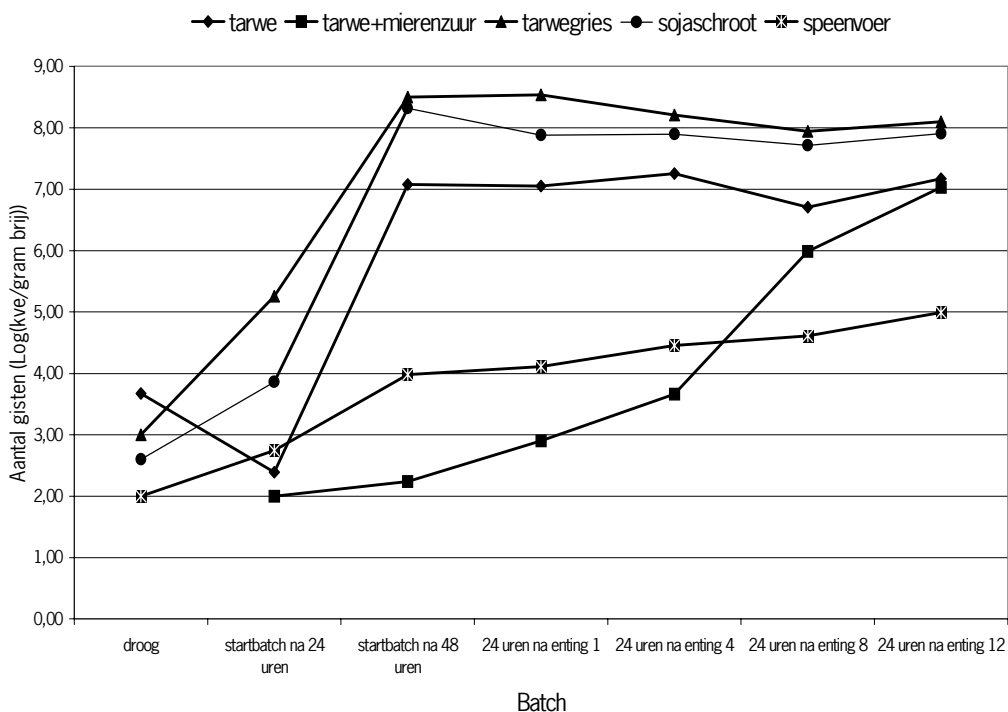
E. coli behoort tot de groep van de enterobacteriën. De ontwikkeling van het aantal *E. coli* bacteriën in de vijf producten is redelijk vergelijkbaar (figuur 8) met die van de enterobacteriën. Ook het aantal *E. coli* bacteriën in tarwe, tarwegries en het speenvoer was 24 uren na inzet van de startbatch het hoogst terwijl 48 na inzet van de startbatch het minimum werd bereikt. Het aantal *E. coli* bacteriën in sojaschroot bereikte 48 uren na inzet van de startbatch het maximum waarna tijdens de overentingen een geleidelijke daling plaatsvond. Het aantal *E. coli* bacteriën was 24 uren na overenting 12 nog minimaal een factor 100 hoger dan in de overige producten.

Figuur 8 Verloop van het aantal *E. coli* bacteriën

Gisten

In figuur 9 is de ontwikkeling van het aantal gisten in de vijf producten weergegeven. Tarwegries en sojaschroot vertoonden direct na inzet een sterke stijging van het aantal gisten tot aan 48 uren na inzet. Daarna vond een stabilisering van het aantal gisten plaats (in beide producten ongeveer 1×10^8 kve/gram). In tarwe nam dit direct na inzet af, waarna het vanaf 24 uren na inzet sterk toenam en vervolgens stabiliseerde op een niveau van ongeveer 1×10^7 kve/gram.

Bij inzet waren in de tarwe+mierenzuur geen gisten aanwezig waarna deze gedurende het proces van overenten bleef toenemen tot een niveau van ongeveer 1×10^7 kve/gram na de twaalfde overenting. In het complete speenvoer nam het aantal gisten continu geleidelijk toe tot en met de laatste overenting. Echter het niveau van gisten in het complete speenvoer was na twaalf overentingen nog steeds lager dan in de overige vier producten.

Figuur 9 Verloop van het aantal gisten

Schimmels

In tabel 1 is de ontwikkeling van het aantal schimmels in de vijf producten weergegeven. De gebruikte voedingsbodem voor schimmels was ook bruikbaar voor gisten. Waar het aantal gistkolonies groter was dan het aantal schimmelkolonies, is de verdunning waarbij telplaten al volgroeid zijn met de gistkolonies de detectiegrens voor de schimmels. In die gevallen staat in tabel 1 de detectiegrens voor de schimmels vermeld.

Tabel 1 Ontwikkeling van het aantal schimmels (Log KVE/g brij)

	tarwe	tarwe + mierenzuur	tarwegries	sojaschroot	speenvoer
Droog	2,85	0	2,6	3,53	2,48
Startbatch na 48 uren	2,65	<2	<3	2,74	<2
24 uren na enting 1	<3	<2	<4	<4	<2
24 uren na enting 8	<5	<2	<5	<5	<2
24 uren na enting 12	<4	<2	<5	<5	<2

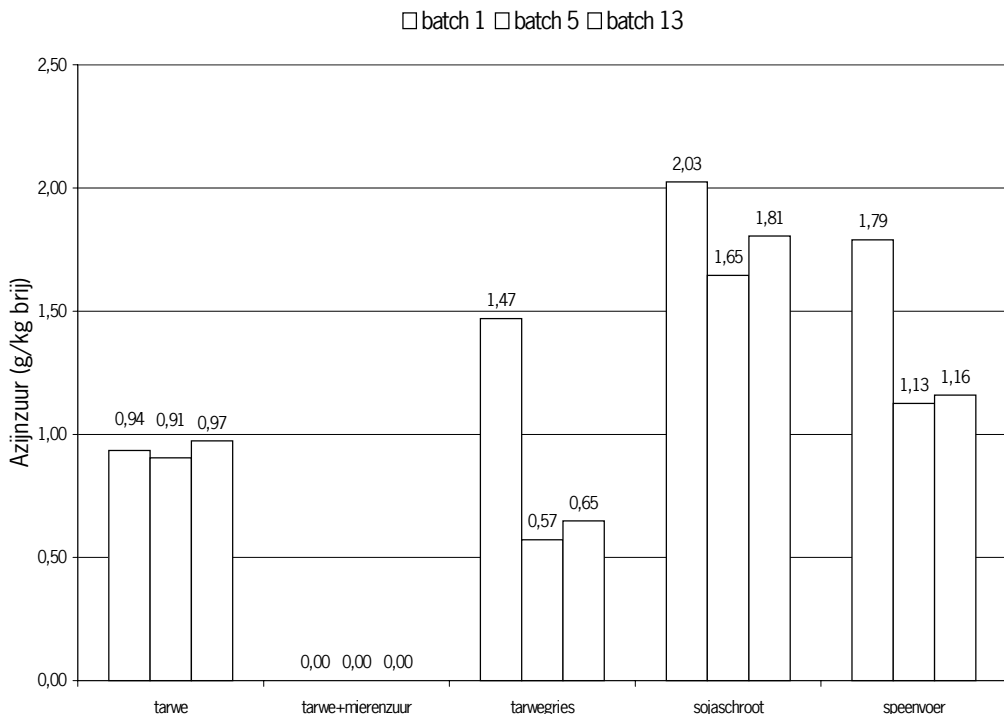
Door de overgroei met gisten kunnen we geen goed beeld vormen van de ontwikkeling van het aantal schimmels in de grondstoffen. Alleen voor tarwe+mierenzuur en het compleet speenvoer kan met zekerheid worden gesteld dat het aantal schimmels laag was.

3.4 Fermentatieproducten

Azijnzuur, propionzuur en boterzuur

Figuur 10 toont de ontwikkeling van het gehalte aan azijnzuur in de startbatch (24 uren na inzet) en 24 uren na de vierde en twaalfde overenting. Hieruit blijkt dat het azijnzuurgehalte in de drie batches met tarwe vrij constant was (ongeveer 0,94 g/kg brij). In tarwe + mierenzuur is nooit azijnzuur aangetoond, terwijl het azijnzuurgehalte in de startbatches van tarwegries, sojaschroot en speenvoer hoger was dan na respectievelijk vier en twaalf keer overenten. De concentratie azijnzuur in sojaschroot was het hoogst. In een van de twee startbatches met sojaschroot was propionzuur aanwezig (0,582 g/kg), terwijl in alle overige batches van alle producten dit ontbrak. Afgezien van een van de twee startbatches met speenvoer (0.237 g/kg) is in geen enkel product op geen enkel tijdstip boterzuur gevonden.

Figuur 10 Verloop van de concentratie azijnzuur

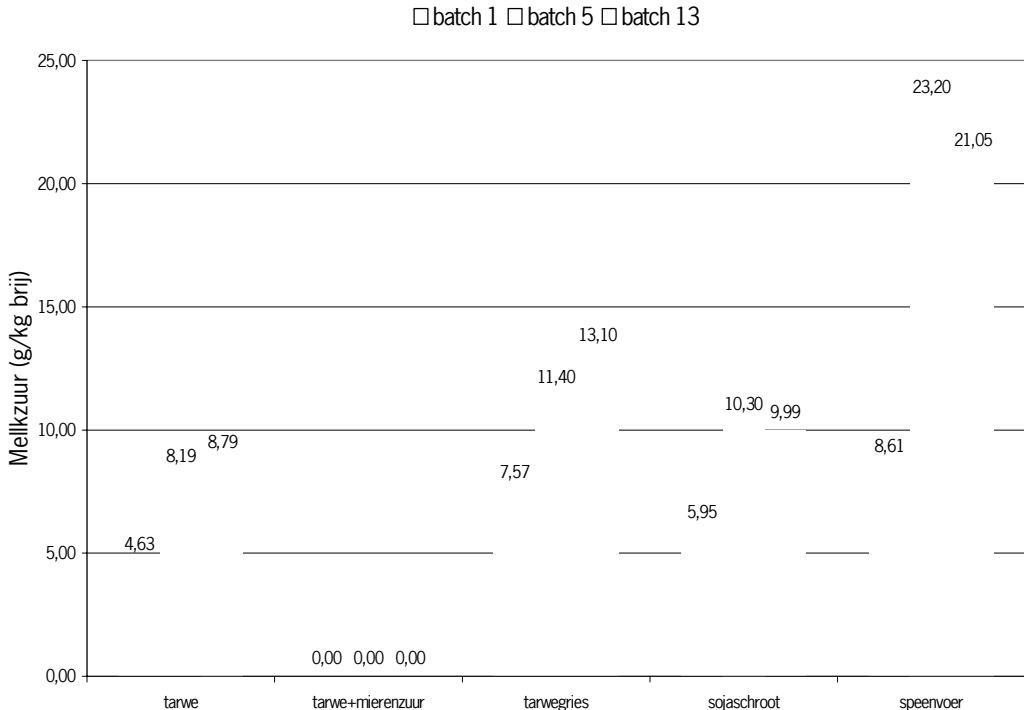


Melkzuur

In figuur 11 is de ontwikkeling van het gehalte aan melkzuur in de vijf producten weergegeven. Hier blijkt dat in geen enkele batch van tarwe + mierenzuur melkzuur aanwezig was. In de overige vier producten trad er tijdens het proces van overenten een aanzienlijke stijging van het melkzuurgehalte

op. De concentraties melkzuur in de startbatches (24 uren na inzet) van tarwegries en het complete speenvoer zijn redelijk vergelijkbaar en gemiddeld ongeveer 2,8 g/kg brij hoger dan in tarwe en sojaschroot. Na 12 keer overenten is de concentratie melkzuur in tarwe, tarwegries en sojaschroot bijna verdubbeld ten opzichte van de startbatch (24 uren na inzet), terwijl deze in het complete speenvoer ongeveer 2,5 maal hoger is. Ten opzichte van de concentratie na vier keer overenten is de concentratie melkzuur na 12 keer overenten in het complete speenvoer gemiddeld iets lager.

Figuur 11 Verloop van de concentratie melkzuur



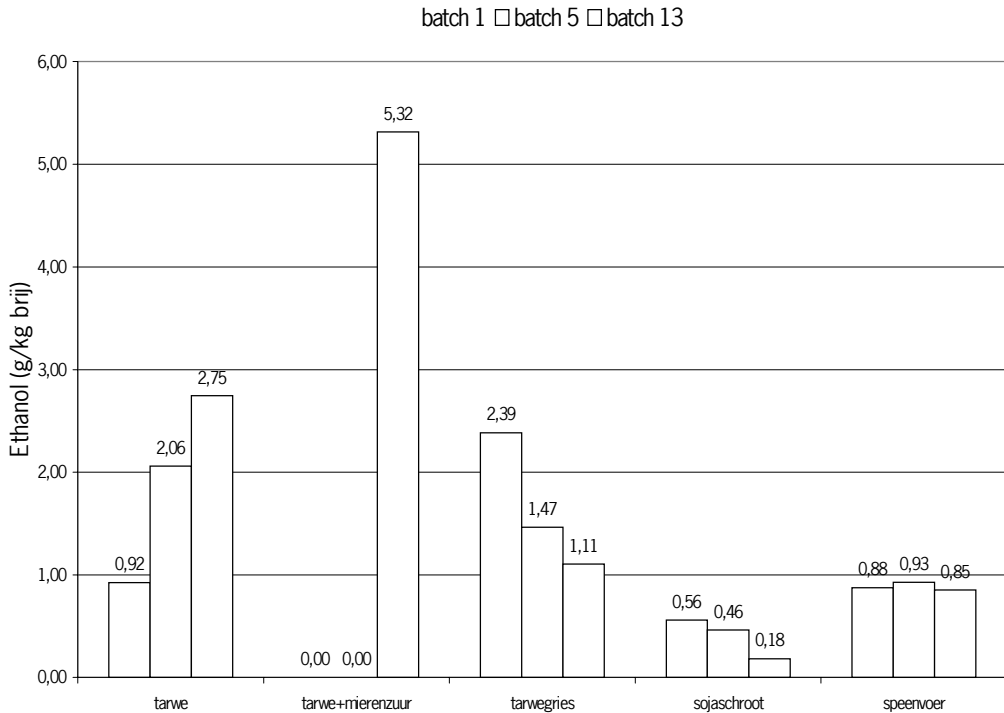
Alcoholen

In figuur 12 is de ontwikkeling van het gehalte aan ethanol in de vijf producten weergegeven. Het blijkt dat in de startbatch en batch 5 (= na 4 keer overenten) van tarwegries + mierenzuur geen ethanol aanwezig was, terwijl in batch 13 (= na 12 keer overenten) de gemiddelde ethanolconcentratie 5,3 g/kg brij was. Het gemiddelde ethanolgehalte in tarwe nam gedurende het proces van overenten toe van 0,9 g/kg in de startbatch tot 2,8 g/kg na 12 keer overenten. In zowel tarwegries (van 2,4 naar 1,1 g/kg) als sojaschroot (van 0,6 naar 0,2 g/kg) was een afname in het gehalte aan ethanol gedurende het overenten. Het ethanolgehalte in speenvoer bleef redelijk constant tijdens het overenten (0,89 g/kg).

Naast ethanol bevatte tarwegries, sojaschroot en speenvoer eveneens 2,3-butaandiol. In de batches 5 en 13 van tarwegries was respectievelijk gemiddeld 0,02 g/kg en 0,19 g/kg 2,3-butaandiol aanwezig. In de batches 1, 5 en 13 van sojaschroot vonden we achtereenvolgens 0,12 g/kg, 0,09 g/kg en 0,14 g/kg 2,3-butaandiol. Batch 5 van het speenvoer bevatte geen 2,3-butaandiol, terwijl in batch 1 en batch 13 respectievelijk 0,06 en 0,04 g/kg 2,3-butaandiol

aanwezig was. Batch 1 en batch 13 van tarwegries bevatte naast 2,3 propaandiol eveneens respectievelijk 0,04 en 0,18 g/kg 1,2-propaandiol.

Figuur 12 Verloop van de concentratie ethanol



Aminozuren

In bijlagen 5 en 6 staan de gehalten aan cystine en methionine in sojaschroot en speenvoer bij inzet van de start batch en 24, 96 (sojaschroot) en 168 (speenvoer) uren na 12 keer overenten. Hieruit blijkt dat de gehalten aan methionine en cystine tijdens het proces van fermenteren en overenten in beide relatief eiwitrijke producten nauwelijks veranderd zijn.

4 Conclusies

Fermentatie van de startbatch

Uit de resultaten blijkt dat de startbatch van zowel tarwe als tarwegries binnen 24 uren een pH van ongeveer 4 heeft bereikt. De startbatch van het complete speenvoer bereikte 48 uren na inzet een pH van 4, terwijl de pH van sojaschroot na 30 uren een pH van 5 had die vervolgens op dit niveau bleef. De pH van de door Rijnen en Scholten (1998) gebruikte start- en afmestvoeders had na 48 uren fermenteren een waarde van respectievelijk 4,8 en 4,4. Daarentegen geven Russel et al. (1996) aan dat de pH van een brijvoer voor biggen (nat gemaakt droogvoer) 4 à 5 dagen nodig had om een pH onder de 4 te bereiken. De voeders van zowel Rijnen en Scholten (1998) als Russel et al. (1996) bevatten koper en antimicrobiële groeibevorderaars. Het complete speenvoer uit de huidige proef bevatte geen antimicrobiële groeibevorderaars en slechts lage gehalten aan koper en zink (respectievelijk 46 en 120 mg/kg). Deze verschillen in samenstelling vormen, door de remmende effecten van deze additieven op de ontwikkeling van microorganismen, een mogelijke verklaring voor de snellere pH-daling van het speenvoer in de huidige proef. Daarnaast bevatte het biggenvoer van Russel et al. (1996) hogere gehalten aan ruw eiwit (230-240 g/kg) dan het complete speenvoer uit de huidige proef (175 g/kg). Aangezien eiwit een bufferende werking heeft, kan dit eveneens een verklaring zijn voor het verschil in snelheid van de pH-daling. Ook verschillen in water:voer-verhouding en temperatuur kunnen bijdragen aan de verschillen tussen genoemde studies. Zowel Rijnen en Scholten (1998) als Russel et al. (1996) gebruikten een hogere water:voer-verhouding (2,5:1), waardoor meer verdunning optreedt van de aanwezige H⁺-ionen met als gevolg een minder snelle pH-daling. De omgevingstemperatuur tijdens beide studies is niet vermeld door de betreffende auteurs.

Oude Elferink et al. (1999a) geven aan dat bij een start pH van rond de 6 à 7 en bij beschikbaarheid van voldoende suikers de spontane fermentatie die optreedt ook voornamelijk een melkzuurfermentatie zal zijn. Indien de pH-daling als gevolg van de melkzuurfermentatie niet voldoende is (bij voorkeur pH ≤ 4,5; Van Winsen et al., 2000) of niet snel genoeg is, krijgen ongewenste organismen zoals Clostridia en enterobacteriën (waaronder E. coli en Salmonella) een kans. Door de relatief hoge pH na 48 uren fermenteren van de startbatch met sojaschroot is dit risico dus aanwezig. Uit figuur 7 blijkt dat het aantal Enterobacteriën in de startbatch met sojaschroot na 48 uren nog relatief hoog was ten opzichte van de overige producten. Dit kan waarschijnlijk verklaard worden door de hoge buffercapaciteit van eiwitrijke grondstoffen (Partanen en Mroz, 1999). Daarnaast is het aandeel makkelijk fermenteerbare nutriënten zoals zetmeel en suikers in sojaschroot relatief laag, waardoor minder snel organische zuren geproduceerd worden. De pH van de startbatch van tarwe+mierenzuur heeft een constante waarde van 4.

Voor een smakelijk en goed geconserveerd eindproduct is melkzuurfermentatie gewenst (Oude Elferink et al., 1999b). De organismen die verantwoordelijk zijn voor het optreden van melkzuurfermentatie zijn melkzuurbacteriën. Bij de fermentatie van ruwvoersilages zijn verscheidene stammen melkzuurbacteriën betrokken: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et cetera. De meerderheid van de melkzuurbacteriën kan groeien bij een temperatuur tussen 5 en 50° C met een optimum van 25-40° C (Oude Elferink et al., 1999b). Daarom is in het huidige experiment gekozen voor een omgevingstemperatuur van 30° C.

Uit figuur 6 blijkt dat met uitzondering van tarwe + mierenzuur in alle producten 24 uren na inzet van de startbatch het aantal melkzuurbacteriën sterk verhoogd is ten opzichte van de situatie bij inzet. Ervan uitgaande dat er bij inzet nog geen melkzuur aanwezig was, kan op basis van figuur 11 geconcludeerd worden dat 24 uren na inzet van de startbatch aanzienlijke hoeveelheden melkzuur gevormd zijn in tarwe, tarwegries, sojaschroot en speenvoer. De hoeveelheden melkzuur die gedurende de eerste 24 uren na inzet van de startbatch van deze vier producten worden gevormd zijn hoger dan de melkzuurgehalten die door Rijnen en Scholten (1998) zijn gevonden in complete

start- en afmestvoeders die 24 uren gefermenteerd hebben (± 1 g/kg product). Ondanks dat in de startbatch van tarwe + mierenzuur op 24 en 48 uren na inzet wel melkzuurbacteriën aanwezig waren (figuur 6), kon er 24 uren na inzet van de startbatch geen melkzuur worden aangetoond. Gisten zijn facultatief anaërobe micro-organismen. Dit betekent dat gisten onder zowel anaërobe als aërobe omstandigheden kunnen overleven. Onder anaërobe omstandigheden zetten gisten de aanwezige suikers om in ethanol en kooldioxide. Onder aërobe omstandigheden kunnen vele gistsoorten melkzuur omzetten in kooldioxide en water (McDonald et al., 1991). De afbraak van melkzuur door gisten veroorzaakt een stijging van de pH waardoor verscheidene andere schadelijke organismen weer makkelijker kunnen groeien. Uit figuur 9 blijkt dat de toevoeging van mierenzuur aan tarwe na 48 uren fermenteren leidt tot aanmerkelijk (factor 100.000) lagere aantallen gisten in vergelijking met tarwe zonder mierenzuur. Naast de startbatch van tarwe + mierenzuur was de ontwikkeling van gisten in de startbatch van het complete speenvoer ook relatief laag ten opzichte van de overige drie grondstoffen (factor 1.000 tot 10.000 lager op 48 uren na inzet).

Fermentatie bij overenten

Indien fermentatie op grondstoffen en/of complete rantsoenen voor varkens wordt toegepast, zal dit zeer waarschijnlijk gebeuren in de vorm van een batchproces. Dit houdt in dat na een bepaalde fermentatietijd het substraat opgenomen wordt in een rantsoen waarna weer een nieuwe batch ingezet wordt. Om het gewenste fermentatieproces (melkzuurfermentatie) van de grondstoffen vlot op gang te laten komen, kan een deel van de voorgaande batch gebruikt worden als entmedium voor de volgende batch (Jensen and Mikkelsen, 1998). In het huidige experiment is telkens 10% van de voorgaande batch gebruikt als entmedium voor de volgende batch. Om een ophoping van gisten en andere ongewenste micro-organismen te voorkomen, is het gewenst dat de hoeveelheid entmedium zo klein mogelijk is. Anderzijds moet de melkzuurfermentatie in de praktijk snel genoeg kunnen verlopen om een bepaalde voerfrequentie te kunnen halen. Uit de resultaten blijkt dat de zuurgraad 24 uren na overenting voor alle producten redelijk stabiel is. Zelfs na 13 keer overenten. Afgezien van sojaschroot is de pH van alle producten 24 uren na elke overenting lager dan 4. De pH van sojaschroot stabiliseerde zich binnen 24 uren na elke overenting op een waarde tussen 4,4 en 4,6. Ondanks deze verdere pH-daling ten opzichte van de situatie 48 uren na inzet van de startbatch is deze pH toch nog te hoog om de ontwikkeling van Enterobacteriën uit te sluiten (Van Winsen et al, 2000). Uit figuur 7 blijkt ook dat het aantal Enterobacteriën na overenten in sojaschroot aanzienlijk hoger was dan in de overige vier producten.

De aanwezigheid van het alcohol 2,3-butaandiol in tarwegries, sojaschroot en het complete speenvoer vormt een goede aanwijzing voor enterobacteriële activiteit (Oude Elferink et al., 1999a). Enterobacteriën die voorkomen in ruwvoersilages zijn over het algemeen niet pathogeen. Hun ontwikkeling is echter ongewenst, omdat ze concurreren met melkzuurbacteriën om de beschikbare suikers. Tevens zijn ze in staat om eiwit af te breken waarbij ongewenste stoffen als biogene aminen en vertakte vetzuren ontstaan. Biogene aminen hebben een remmend effect op de voeropname (Mc Donald et al; 1991; Oude Elferink et al., 1999).

Evenals sojaschroot bevatte het complete speenvoer ook aanzienlijke hoeveelheden eiwit (175 g/kg). Daarnaast bevatte het complete speenvoer synthetische aminozuren (methionine, threonine en tryptofaan). Deze aminozuren worden verondersteld makkelijk beschikbaar te zijn voor microbiële omzettingen. In Deense praktijkproeven (Pedersen, 1999) met het verstrekken van een gefermenteerd compleet speenvoer aan biggen bedroeg het verlies aan totaal lysine maximaal 25%. In het huidige onderzoek zijn geen aanwijzingen gevonden voor afbraak van de aminozuren methionine en cystine in sojaschroot en het complete speenvoer terwijl dit speenvoer synthetisch methionine bevatte (bijlagen 5 en 6).

Ondanks dat tijdens het traject van overenten het aantal melkzuurbacteriën in tarwe + mierenzuur met een factor 100 toenam ten opzichte van de situatie in de startbatch, was zelfs na 13 keer overenten geen melkzuur aanwezig. De oorzaak hiervan is niet bekend.

Tijdens het traject van overenten was het niveau van het aantal gisten in tarwe, tarwegries en sojaschroot continu vergelijkbaar met het niveau van 48 uren na inzet van de startbatch. Het complete speenvoer liet een lichte stijging zien in het aantal gisten, maar bleef aanmerkelijk lager dan de eerder genoemde drie producten. De toevoeging van mierenzuur aan tarwe kon niet verhinderen dat tijdens het traject van overenten het aantal gisten geleidelijk toenam. Na 12 keer overenten was het aantal gisten in tarwe + mierenzuur vergelijkbaar met tarwe. De gisten in tarwe + mierenzuur breken dus als het ware door de zuurbarrière heen. De relatief hoge concentratie van ethanol in tarwe + mierenzuur na 12 keer overenten duidt op een hoge activiteit van de gisten. De activiteit van de gisten in tarwe + mierenzuur kwam waarschijnlijk pas op gang na 9 keer overenten (=batch 10), aangezien het gewichtsverlies in batch 10 enorm was toegenomen ten opzichte van batch 9. Tot en met batch 9 was het gewichtsverlies in tarwe + mierenzuur vrij constant (5-10 gram). Dit wordt bevestigd door de afwezigheid van ethanol in batches 1 en 5. Een belangrijke reden van deze hoge activiteit van gisten in tarwe + mierenzuur is zeer waarschijnlijk dat de gisten niet of nauwelijks hoefden te concurreren met de melkzuurbacteriën om de aanwezige suikers. Er is immers geen melkzuur gevormd in dit product.

Gisten in de tarwegriesbrij

Gisten spelen een belangrijke rol bij bederf van gefermenteerd brijvoer, omdat zij onder aërobe omstandigheden met melkzuurbacteriën concurreren om de aanwezige suikers. Hierdoor wordt het verloop van de melkzuurfermentatie verstoord waardoor de pH van de brij minder snel daalt. Eveneens kunnen gisten in de aanwezigheid van zuurstof melkzuur afbreken waardoor de pH stijgt en een goed gefermenteerde brij zelfs nog kan bederven. Hoge gistaantallen zijn daarom een indicator voor een slechte brijfermentatie. Ondanks dat in de inoculant van de tarwegriesbrij (10% van de voorgaande batch) telkens hoge gistaantallen waren, verminderde de pH-daling in de nieuwe batch van tarwegries niet. Eveneens vond er geen noemenswaardige toename van bederforganismen plaats. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat de gisten in de tarwegries niet tot de soorten behoorden die normaal voor bederf zorgen. Een andere mogelijkheid is dat alleen de gisten die zich in de onderste (anaërobe) laag van de tarwegries bevinden bederf kunnen veroorzaken, terwijl de gisten in de bovenlaag (getalsmatig waarschijnlijk de meerderheid) geen bederf veroorzaken. Om meer inzicht te krijgen in de gisten in tarwegriesbrij zijn de gisten in de toplaag (aërobe condities) en in de rest (anaërobe condities) nader bestudeerd (Oude Elferink en Van Wiskelaar, intern rapport). Hieruit bleek dat gisten in zowel de bodem- als toplaag van tarwegriesbrij voor bederf kunnen zorgen. De aantallen gisten in de toplaag zijn dusdanig hoog (10^9 KVE/g) dat dit bederf binnen één dag verwacht mag worden. Het aantal gisten in de bodemlaag is veel lager en zal dus ook iets meer tijd nodig hebben. Bij het doorenten van tarwegriesbrij is het dus zaak om alleen de bodemlaag te gebruiken en niet eerst te mengen. Zodra de gistaantallen in de bodemlaag ook beginnen op te lopen, is het van belang te starten met een nieuwe batch en niet meer over te enten. Het heeft de voorkeur om de toplaag van de gefermenteerde tarwegriesbrij (en zeer waarschijnlijk ook van de andere grondstoffen) niet te vervoederen met het oog op het hoge risico op bederf.

Toepassing van fermentatie én grondstofkeuze in de praktijk

Verstrekking van gefermenteerd voer kan mogelijk bijdragen aan het voorkomen van maagdarfstoornissen bij biggen (Scholten et al., 1999). Hierdoor vormt het gebruik van gefermenteerd voer mogelijk een alternatief voor antimicrobiële groeibevorderaars (AMGB's) in varkensvoer. Een belangrijke voorwaarde voor een succesvol gebruik van gefermenteerd voer is een goed verloop van de fermentatie zodat snel en veel melkzuur wordt gevormd waardoor de pH

snel daalt tot rond pH 4. Hierdoor krijgen schadelijke micro-organismen zoals *Escherichia coli*, *Clostridia* en *Salmonella* bacteriën geen kans. Eveneens is het belangrijk dat de gefermenteerde voeders zo min mogelijk blootgesteld worden aan lucht zodat de kans op aëroob bederf via gisting zo klein mogelijk is. Om de ontwikkeling van melkzuur te stimuleren is de omgevingstemperatuur (inclusief watertemperatuur) minimaal 25° C en bij voorkeur nog hoger. Toepassing van een oudere batch gefermenteerd voer als entmedium (=overenten) voor een nieuwe batch versnelt het fermentatieproces eveneens. In dit onderzoek is ervoor gekozen om 10% van de oude batch te gebruiken als entmedium voor een nieuwe batch. Een hoger percentage versnelt waarschijnlijk de fermentatie nog verder. Om meerdere keren per dag te kunnen voeren met een beperkt aantal fermentatievaten is het voor de praktijk gewenst om binnen 12 uren na overenting de gewenste pH (< pH4) te bereiken. Vanuit praktisch oogpunt lijkt een grotere hoeveelheid entmedium gewenst. In Engeland (Moran et al., in voorbereiding) wordt 33% als entmedium gebruikt. Echter, er blijven telkens ook meer ongewenste organismen achter (zoals gisten) die de kans op ontsporing van de fermentatie vergroten. Duidelijke aanwijzingen voor een maximum aan het aantal keren dat overgeënt kan worden heeft het huidige onderzoek niet opgeleverd. Onderzoek van Scholten (Scholten, persoonlijke mededeling) waarin de fermentatie van tarwemeel werd gestimuleerd door overenting gaf aan dat het vanwege de complexiteit van het fermentatieproces (veel factoren hebben invloed) zeer moeilijk is om een vuistregel aan te geven voor het maximum aantal overentingen. De resultaten van het onderzoek van Oude Elferink en Van Wikselaar (2001) suggereren om de gistconcentraties in de bodemlaag van een fermentatievat te gebruiken als richtlijn om te beslissen om te stoppen met overenten. In de praktijk wordt bij de toepassing van bijproducten gestreefd naar minder dan 100.00 kve/g aan gisten. De resultaten van dit onderzoek geven aan dat een eiwitrijke grondstof als sojaschroot niet geschikt is als fermentatiesubstraat. De pH blijft te hoog waardoor enterobacteriële activiteit mogelijk blijft en zeer ongewenste organismen als *Salmonella* en *E. Coli* een kans krijgen. Ondanks een goede pH was er waarschijnlijk ook enige mate van enterobacteriële activiteit (aanwezigheid van 2,3 butaandiol) in de tarwegries en het complete speenvoer. Bij toepassing van tarwegries als fermentatiesubstraat moet eveneens gelet worden op het aantal gisten. Door regelmatig de toplaag vlak voor overenten te verwijderen kunnen gisten waarschijnlijk beter in de hand gehouden worden. Hoewel dit in de praktijk misschien moeilijk te realiseren is, is dit voor een fermentatieproces met overenting altijd aan te bevelen.

Fermentatieprotocol

Op basis van de bevindingen van dit onderzoek én op basis van de literatuur wordt onderstaande werkwijze aanbevolen voor de fermentatie van veevoedergrondstoffen:

- 48 uren voorafgaand aan de eerste voerbeurt worden koolhydraatrijke en relatief eiwitarme grondstoffen (granen) samen met warm water (30° C) gedoseerd in een verwarmd vat (30° C). Dit mengsel vervolgens rustig roeren tot een homogeen mengsel. Tijdens het roeren zorgen dat er geen lucht in het mengsel komt. Direct na het roeren wordt de pH gemeten. Tijdens de volgende 48 uren het mengsel niet meer roeren en regelmatig (elke 12 uren) de pH meten.
- na 48 uren (of bij het bereiken van een pH van 4) wordt het mengsel rustig geroerd, de pH gemeten en wordt 70% van de oorspronkelijke hoeveelheid opgenomen in het rantsoen. Het aandeel gefermenteerd substraat in het totale rantsoen moet dusdanig groot zijn dat de pH van het totale rantsoen beneden pH 4,5 ligt -bij voorkeur pH 4-. In het geval van een rantsoen voor gespeende biggen ligt het voor de hand om de granen (met name tarwe en gerst) te gebruiken als fermentatiesubstraat. De resultaten van dit onderzoek suggereren ook mogelijkheden voor VOOS rijke en relatief zetmeelarme grondstoffen (tarwegries) als fermentatiesubstraat.

- Vervolgens wordt vers substraat en warm water aan de resterende 30% substraat toegevoegd en gemengd (=overenten). Dit mengsel krijgt de tijd om bij een temperatuur van 30°C te fermenteren tot pH 4 of lager. Hierbij moeten we streven naar een fermentatietijd van 12 uren. Het is op dit moment nog niet duidelijk of met een entmedium van 30% binnen 12 uren pH 4 bereikt kan worden.
- Ondanks dat het huidige onderzoek geen aanwijzingen heeft opgeleverd over het maximale aantal keren dat overgeënt kan worden zonder dat bederf optreedt, is het toch aan te bevelen om regelmatig (wekelijks) het systeem schoon te maken en weer op te starten met een verse batch substraat.

Literatuur

- Bruininx, E.M.A.M. en C.M.C. van der Peet-Schwering 1996. Speendiarree bij biggen: de factoren voeding en Escherichia coli. Praktijkonderzoek Varkenshouderij, proefverslag P1.159.
- CVB, 2000. Veevoedertabel, Centraal Veevoederbureau, Lelystad.
- Driehuis, F. and P.G. van Wikselaar 1996. Effects of addition of formic, acetic or propionic acid to maize silage and low dry matter grass silage on the microbial flora and aerobic stability. In: Proceedings 11th International Silage Conference. Jones, D.I.H., R. Jones, R. Dewhurst, R. Merry, and P.M. Haigh (Eds.), Aberystwyth, UK., 256-257.
- Geary, T.M. et al. 1996. Performance of weaner pigs fed ad libitum with liquid feed at different dry matter concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 72, 17-24.
- Jensen, B. B. and L.L. Mikkelsen 1998. Feeding liquid diets to pigs. In: Recent Advances in Animal Nutrition. P.C. Garnsworthy and J. Wiseman (Eds.), 107-126, Nottingham University Press.
- McDonald, P., A.R. Henderson, and S.J.E. Heron. 1991. The biochemistry of silage. 2nd edition. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- Mikkelsen, L.L., and B.B. Jensen, 1997. Effect of fermented liquid feed (FLF) on growth performance and microbial activity in the gastrointestinal tract of weaned piglets. In: Laplace, J.P., Fevrier, C., Barbeau, A, (Eds.), Digestive Physiology in Pigs, E.A.A.P. publication no. 88. Saint Malo, France, May 26-28, p. 639-642.
- Moran, C. et al. (in voorbereiding). The effect of the addition of a starter culture and different proportions of pre-fermented wheat on the fermentation of liquid milled wheat.
- Oude Elferink, S.J.W.H. et al. 1999a. Gewenste en ongewenste microbiële omzettingsprocessen bij de productie van gefermenteerde voeders voor varkens. Samenvatting 24^e studiedag voor Nederlandstalige Voedingsonderzoekers, Gent.
- Oude Elferink, S.J.W.H. et al. 1999b. Silage fermentation processes and their manipulation. Proceedings of the Electronic Conference on Tropical Silage.
- Oude Elferink, S.J.W.H. en P.G. van Wikselaar. Identificatie van gisten in gefermenteerde tarwegries. intern rapport ID-Lelystad.
- Partanen, K. and Z. Mroz 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrient Research Reviews*, 12, 1-30.
- Pedersen, A. 1999. Styret fermentering af vådfoder. Kongres for svineproducenter [deens].
- Russell, P.J. et al. 1996. Performance, water use and effluent output of weaner pigs fed ad libitum with either dry pellets or liquid feed and the role of microbial activity in the liquid feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72, 8-16.

Rijnen, M.M. J.A. en R.H.J. Scholten. 1998. Fermentatie van brijvoeders en bijproducten tijdens opslag. Proefverslag P1.211, Praktijkonderzoek Varkenshouderij, Rosmalen.

Scholten, R.H.J. et al. 1999. Fermented co-products and fermented compound feeds for pigs: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 82, 1-19

Van Winsen R.L. et al. 2000. Mechanisms of Salmonella reduction in fermented pig feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 342-346.

Bijlagen

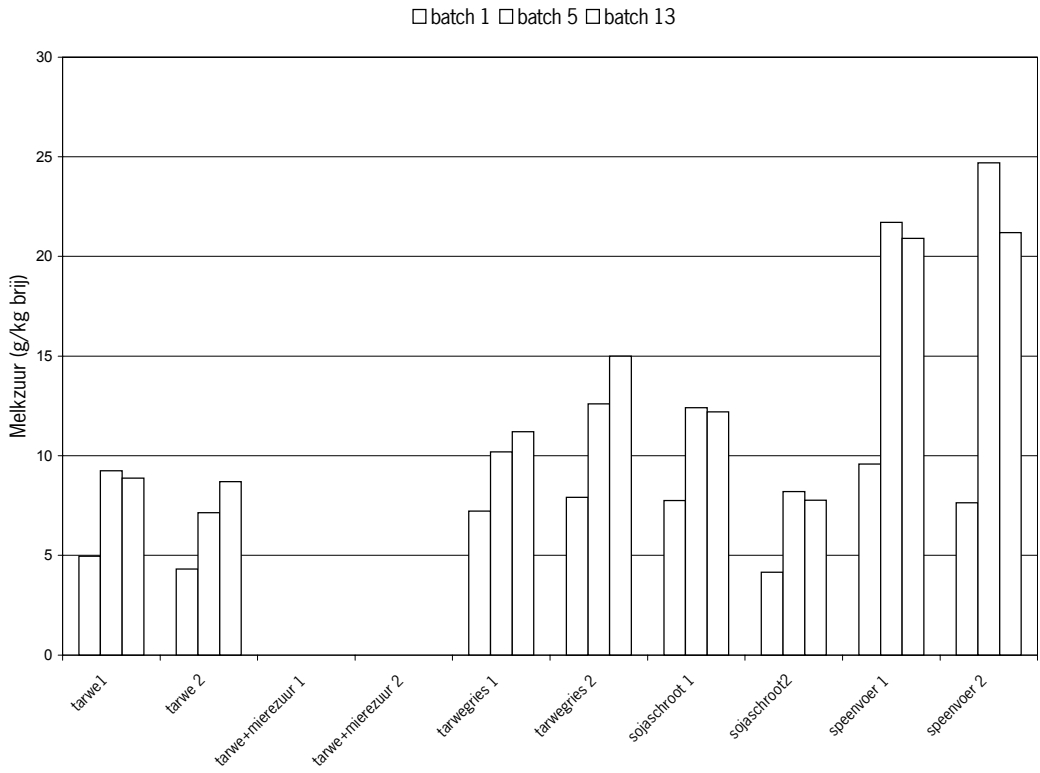
Bijlage 1 Berekende grondstoffensamenstelling en chemische samenstelling van het spenvoer (g/kg)

	Speenvoer
Gerst	349
Tarwe	150
Mais	150
Weipoeder (melksuikerarm)	104
Sojaschroot	60
Sojabonen (getoast)	59
Lijnschilfers	30
Vismeel	30
Mengvet	20,5
Krijt	10,5
Monocalciumfosfaat	3
Melasse	10
Mengzout	1,1
Fytase (FTU)	421
Lysine	3,5
Methionine	2,5
Threonine	6,0
Tryptofaan	5,6
Vitaminen + mineralenpremix ^a	5,0
EW ^b	1,12
Ruw eiwit	175
Zetmeel	382
Ruw vet	52
Ruwe celstof	29
As	62
Synthetisch lysine	2,8
Synthetisch methionine	1,2
Darmverteerbaar lysine	10,2
Darmverteerbaar methionine	3,7
Darmverteerbaar meth. + cyst.	6,1
Darmverteerbaar threonine	5,8
Darmverteerbaar tryptofaan	1,9
Calcium	8,8
Fosfor	5,9
Verteerbaar fosfor	3,9
Zink (mg/kg)	87
Koper (mg/kg)	19

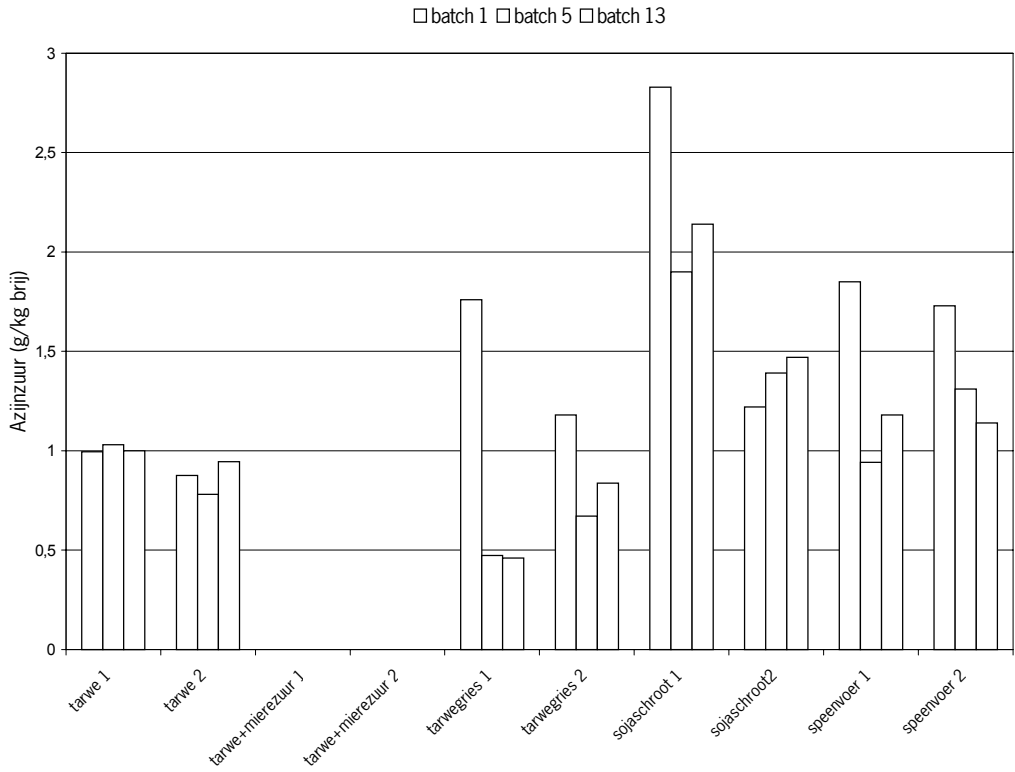
^a De premix bevatte per kg speen- en opfokvoer: vitamine A, 12000 IE; vitamine D3 1800 IE; folinezuur, 0,3 mg; vitamine B12, 17,5 µg; vitamine B3, 10 mg; vitamine E, 30 IE; biotine, 0,05 mg; vitamine K3, 0,5 mg; niacine, 20 mg; vitamine B2, 3,5 mg; choline, 0,5 g; vitamine B6, 1,5 mg; vitamine B1, 1 mg; cobalt, 0,15 mg; koper, 15 mg; ijzer, 100 mg; zink, 53 mg, jodium, 0,45 mg, selenium, 0,25 mg

^b Berekend met behulp van de veevoedertabel (CVB, 2000)

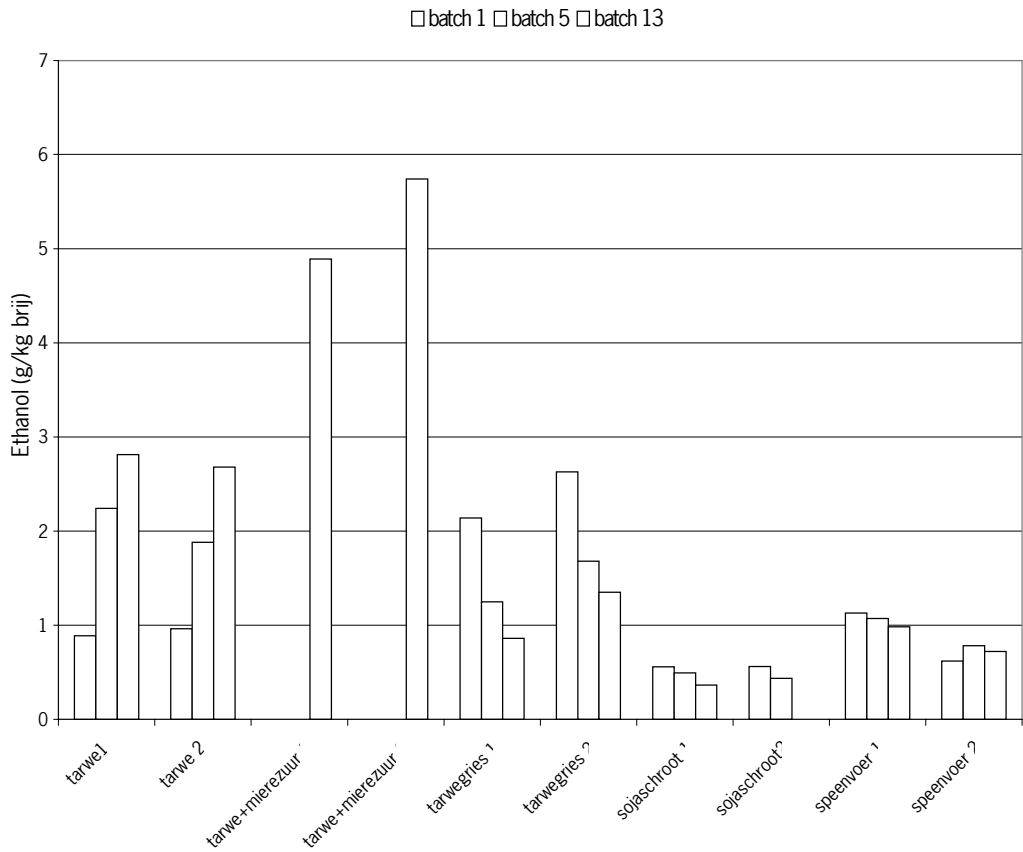
Bijlage 2 Verloop van het melkzuurgehalte per herhaling

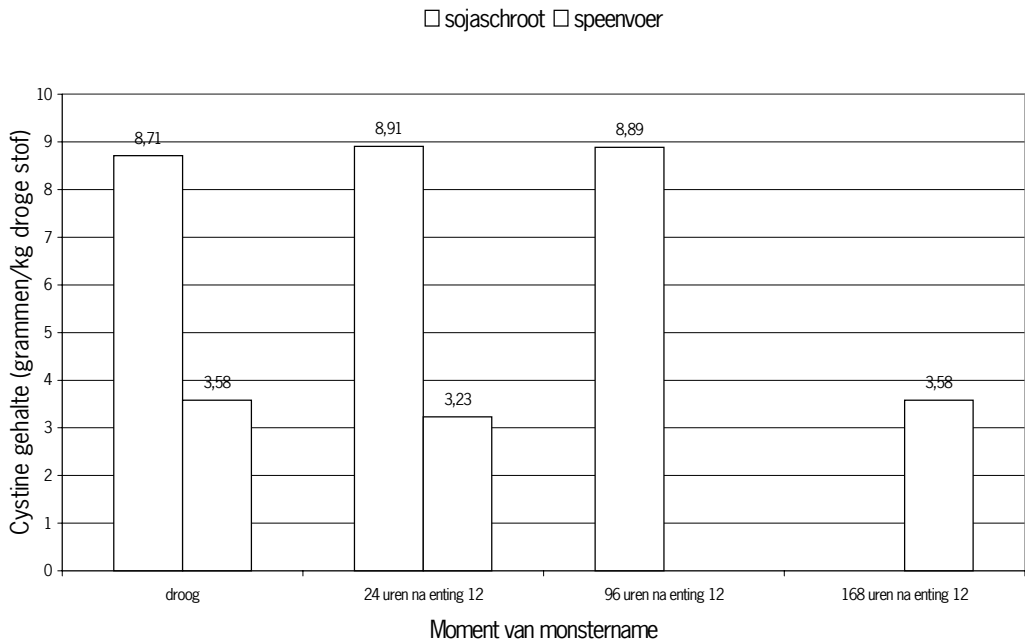


Bijlage 3 Verloop van het azijnzuurgehalte per herhaling



Bijlage 4 Verloop van het ethanolgehalte per herhaling



Bijlage 5 Gehalte aan cystine in sojaschroot en speenvoer bij inzet en 24, 96 (sojaschroot) en 168 (speenvoer) uren na de twaalfde overenting

Bijlage 6 Gehalte aan methionine in sojaschroot en speenvoer bij inzet en 24, 96 (sojaschroot) en 168 (speenvoer) uren na de twaalfde overenting