

"100 jaar celwand onderzoek"

-De waarde van de celwand analyses-

Rapport nr. 117

J.M. van der Meer.

Introductie.

De hier opgenomen tekst is een inleiding gehouden in het kader van de "onderzoekbesprekingen" op 24-4-1978.

Vele analytische methoden zijn in het algemeen na uitgebreid onderzoek op het I.V.V.O. of gelijksoortige instituten geïntroduceerd. Vaak verliep de acceptatie uiterst moeizaam. Maar eenmaal in gebruik bleek het weer afschaffen van deze methoden, hoe slecht ook een bijna onmogelijke zaak.

Het inzicht in vele methoden is door de imposante hoeveelheid literatuur over deel aspecten sterk toegenomen. Tegelijk komt de vraag naar voren waar we eigenlijk mee bezig zijn. De methoden geven niet de bestanddelen welke we wensen, moeten we dan wel deze uitkomsten korreleren met de veel complexere processen welke in de dieren gebeuren?

- De waarde van de celwandanalyses -

pag.

I Inleiding

aanpak voor de toekomst

4

II Koolhydraten

7

A Bindingstypen

*oplosbaarheid
bakteriële werking*

B Morphologie

9

C Analyse

12

*overzicht
keuzegroep i.v.m. doel*

*oplosbaarheid structurele koolhydraten
hydrolyse, oxidatie, reductie*

D Ruwe Celstof

26

*NEN3327-Scharrer-Küschner
NEN3327-NEN3326
ADIN-Maillard, Tannin, HydroxyProline
N-verdeling
NDF-; vergelijking met rc
ADF-; vergelijking met rc*

E Verteerbaarheid

39

*opgroei weidegras i.v.m. samenstelling en
verteerbaarheid
berekening van de verteerbaarheid uit de
chemische analyses.*

III Opmerkingen

43

IV Samenvatting

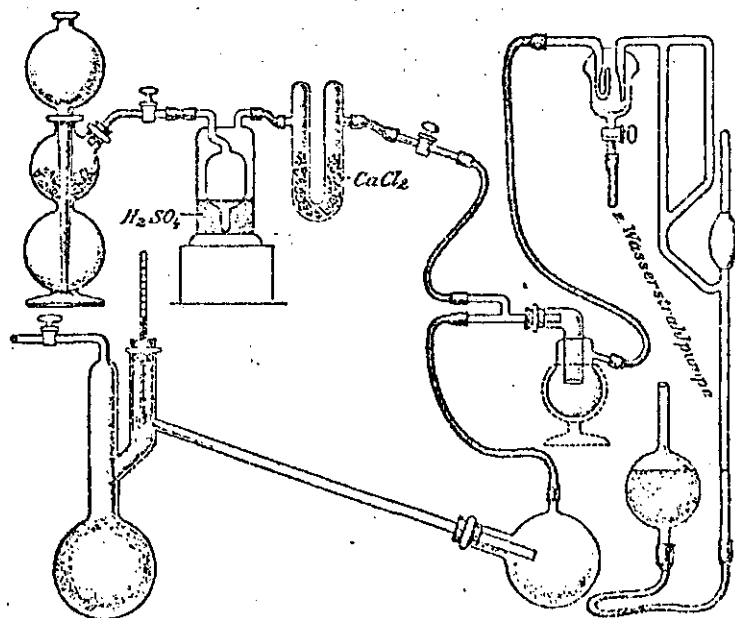
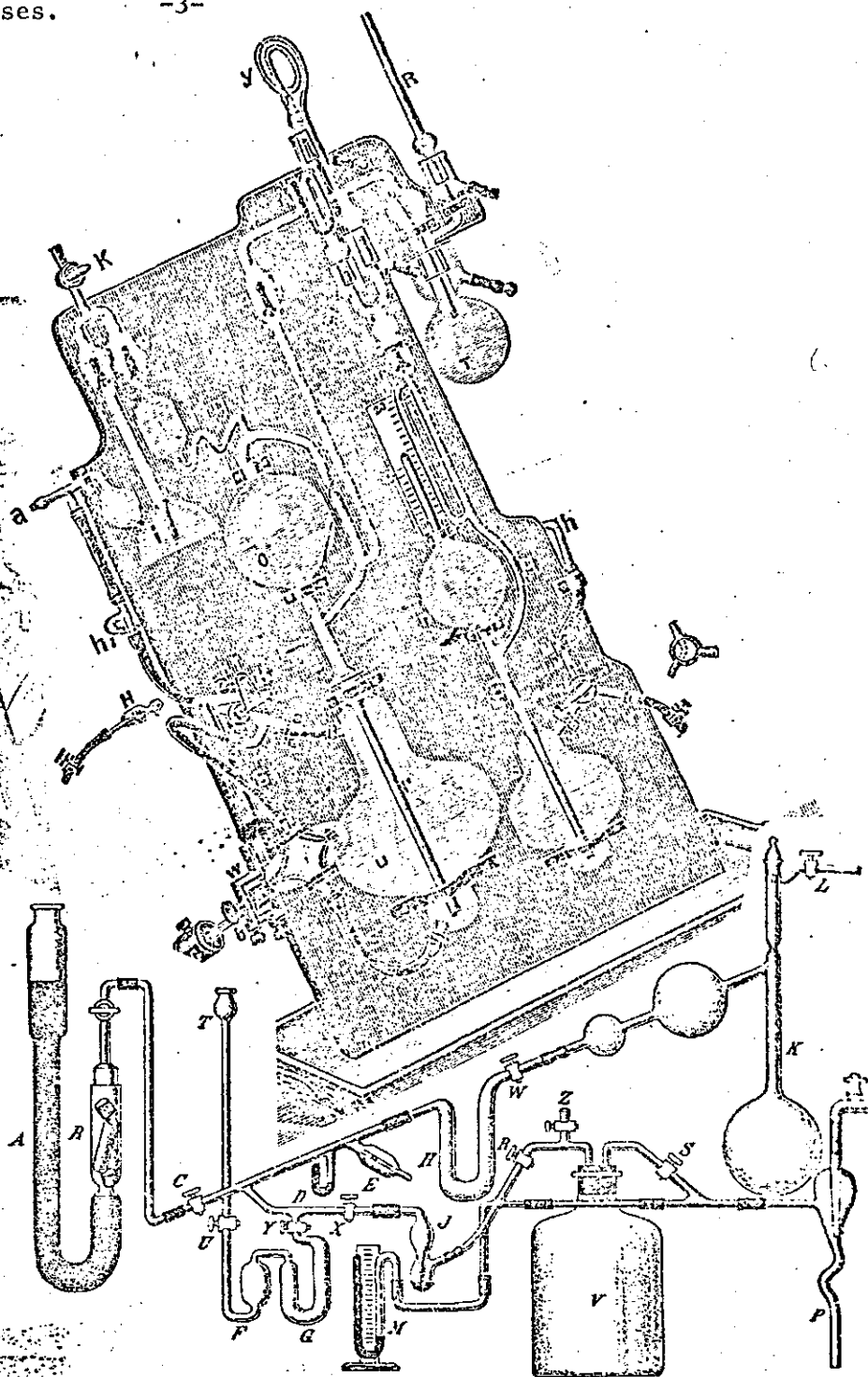
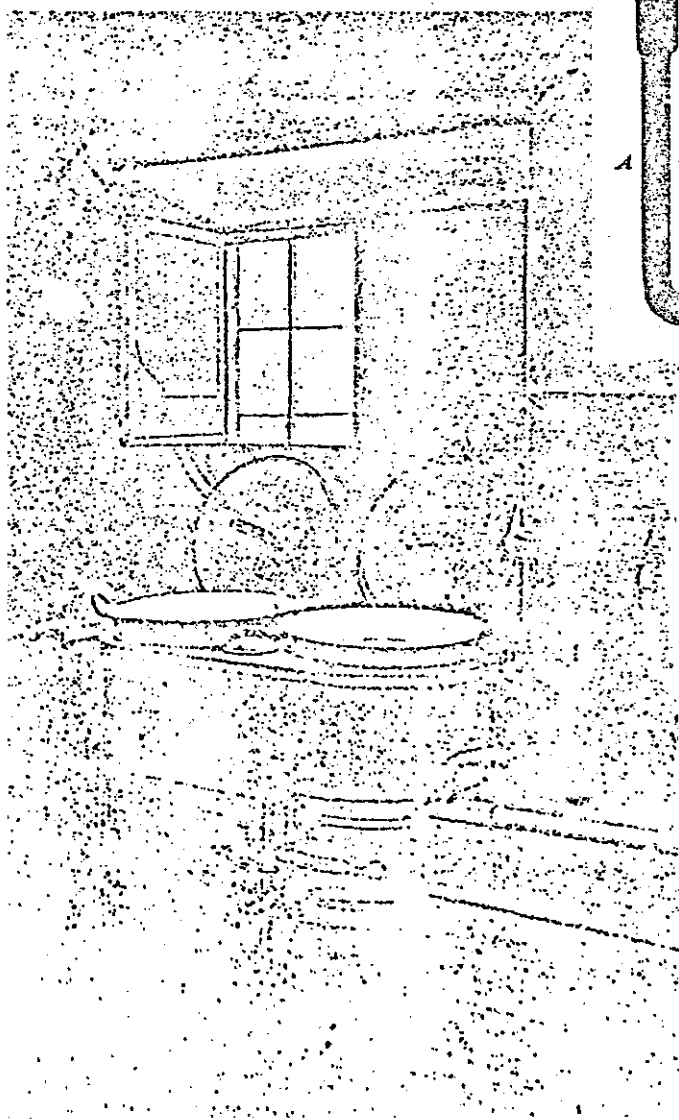
44

V Summary

45

VI Literatuur

46



I Inleiding

STELLING:

Wat 100 jaar celwand onderzoek niet heeft kunnen bereiken zal voortgaande op dezelfde weg ook voor ons onmogelijk blijken.

De problemen rond het gebruik van de uitkomsten van de bepalingen van celwandbestanddelen worden vaak afgeschoven op de slechte uitvoering van de analyses. Het is waar dat de uitkomst van de ruwe celstofbepaling varieert met de keuze van de behandeling. Bijvoorbeeld werd op 1100 m hoogte in Kenia als gevolg van kookpuntsverlaging een toename in het ruwe celstof gehalte gevonden van 1% relatief per graad celsius daling van het kookpunt t.o.v. zeeniveau. (1)

Dit lijkt een verklaring voor de verschillen welke worden gevonden bij koken op de vlam, kookplaat of in een verhittingsblok, met hun verschillende temperatuur overdracht, resulterend in verschillende verhittingsgraden van de vloeistof.

Ondanks de beperkingen van de analytische methoden moeten de problemen rond het gebruik worden teruggevoerd tot het oneigenlijk gebruik, b.v. ten behoeve van de schatting van de voederwaarde.

Wat ontbreekt is vaak een reële korrelatie tussen wat in het dier met koolhydraten gebeurt en wat er in de analyse wordt gemeten.

Het relatief goed functioneren van de "in vitro" verteringsmethode steunt deze bewering, ondanks het feit dat de variatie in de uitkomsten gevonden voor de "in vitro" verteerbaarheid binnen en tussen instituten eigenlijk kleiner zou moeten zijn. Die variatie en die verschillen kunnen door gebruik van standaarden binnen de perken worden gehouden.

Aanpak voor de toekomst

Om op de ruwe celstof bepaling terug te komen; wat is de reden dat die methode nog steeds niet overal is afgeschaft?

Nieuwe methoden worden altijd wat scheef bekeken. De resultaten van die methode zullen getoetst moeten worden op hun bruikbaarheid. Daartoe kunnen de monsters van oude verteerbaarheidsproeven geanalyseerd worden en met deze resultaten kunnen dan nieuwe regressie vergelijkingen worden opgesteld. De verbetering is evenwel vaak gering of levert meer werk op, reden waarom men geneigd is bij het oude te blijven. Dit geeft aanleiding

tot de bewering dat het zoeken naar een super ruwe celstof bepaling een zinloze zaak is. (2).

Er zijn twee mogelijke wegen om wel tot resultaten te komen:

1) De direkte schatting van de voederwaarde met *fysische methoden*. De meest succesvolle ontwikkeling op dit moment is de Infrarood reflectie analyse. (Ook met NMR en ESR zijn succesvolle componentbepalingen uitgevoerd). In het algemeen zijn dit zgn. finger print methoden, waarbij een signaal spectrum wordt verkregen waaruit m.b.v. een grote computer en eventueel hogere wiskunde zoals Fourier analyse de uitkomsten uit meer dimensionale ijkingen kunnen worden verkregen.

Het voordeel is dat de methoden weinig bewerkelijk en zeer snel zijn (fig. 1).

2) De lange weg van leren begrijpen, het zgn. *fundamenteel onderzoek*, om dan vervolgens die analyse methoden te ontwikkelen, welke delen van die processen nauwkeurig beschrijven. Het nadeel hieraan verbonden is dat daarbij meestal blijkt, dat er meerdere soorten analyses nodig zijn, m.a.w. de analyse methodiek wordt nogal bewerkelijk.

De uitwerking van genoemde mogelijkheden tot een voor onderzoek en praktijk bruikbaar systeem is bijna niet meer realiseerbaar, zeker niet binnen één enkel instituut. Op zo'n moment zullen een wiskundige, een analyticus en een veevoedingskundige moeten samenwerken. Te veel onderzoekers hebben naar oplossingen gestreefd en daarbij te weinig aandacht gegeven aan kennis, welke bij anderen disciplines aanwezig was.

Uit gesprekken met de voedingsdeskundigen heb ik begrepen dat van de celwand onderzoekers tenminste tijdelijke oplossingen worden verwacht. Daarom lijkt het mij zinnig de voor- en nadelen van de verschillende methoden welke nu gebruikt worden te beschrijven.

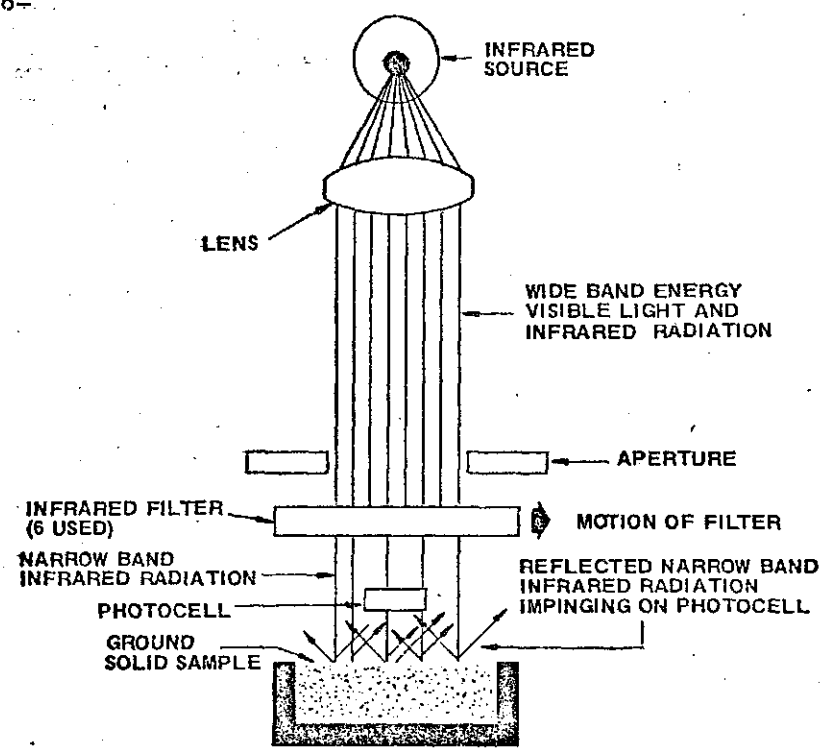


Figure 1a OPTICAL DESIGN OF THE INFRA ALYZER UNIT

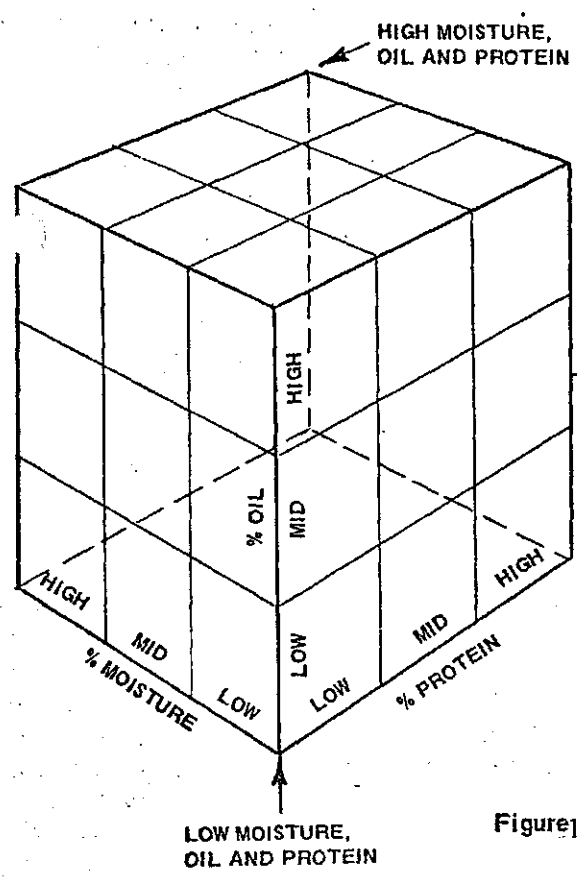


Fig. b

Figure 1c THREE-DIMENSIONAL COMPOSITION MATRIX FOR THE CALIBRATION SAMPLES

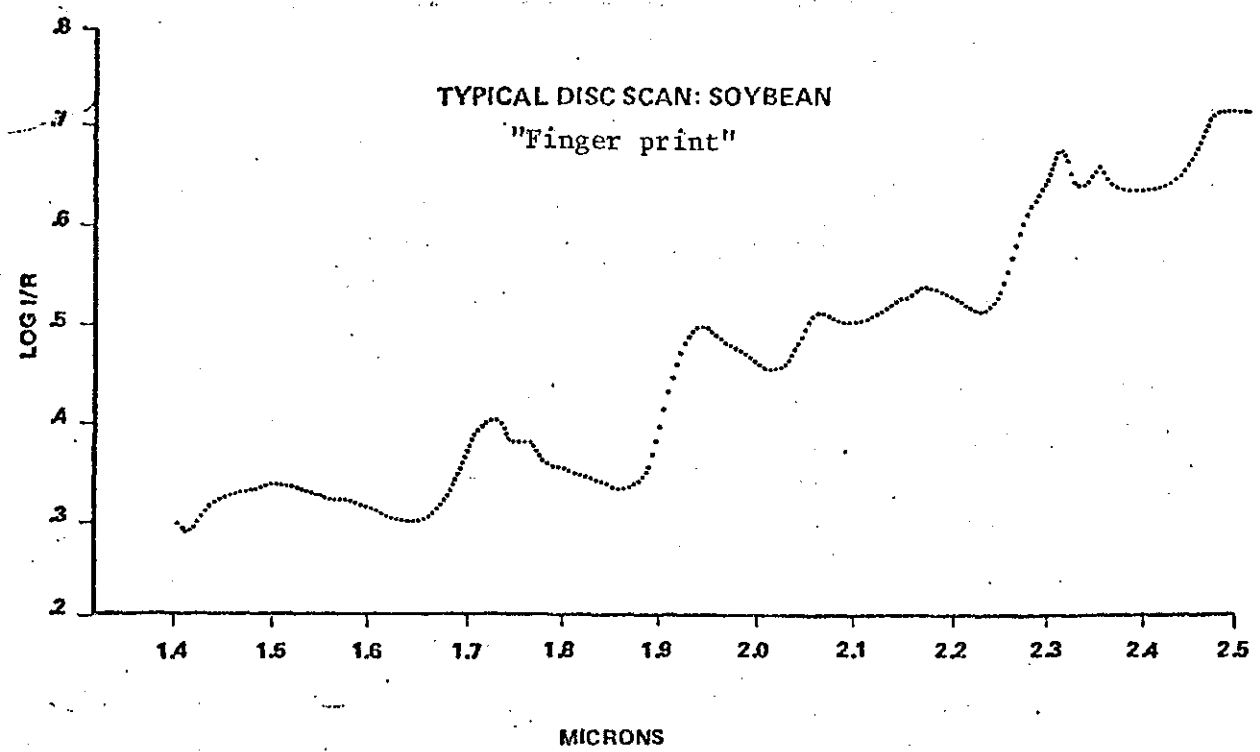


Fig. 1

II Koolhydraten

De aantasting van koolhydraten in het dier is verschillend voor één- en meermagigen.

De herkauwers beschikken over een enorm gistvat, de pens, welke hen in staat stelt grote hoeveelheden plantecelwand in anaeroob medium te verteren, beter gezegd te laten verteren door de microorganismen waarmee ze in symbiose leven. De éénmagigen kunnen de celwand bestanddelen voor slechts een klein deel benutten, voornamelijk door vertering in hun naverbrander, de dikke darm. Alleen bij het paard is deze vertering nog van belang.

A Bindingstypen.

De voedingskoolhydraten zijn in verschillende soorten te onderscheiden, op grond van hun glycoside bindingen en hun *OPLOSBAARHEID*.

De niet structurele koolhydraten zijn vooral de oplosbare suikers, zetmeel en de fructosanen;

de structurele, cellulose, hemicellulose en pectine.

De waarde van componenten in de voeding wordt bepaald door hun afbreekbaarheid, dus niet hun oplosbaarheid. (Tabel 1).

α -glycoside bindingen zijn oplosbaar en kunnen door enzymen in het maagdarmkanaal van zowel één als meermagigen worden omgezet. De benutting hangt sterk af van de vertakkingsgraad en de passagesnelheid. Generaliserend kun je zeggen dat zetmeel voor 20% uit het oplosbare amylose en voor 80% (4) uit het onoplosbare amylopectin bestaat.

Intakt zijn zetmeelgranules onoplosbaar in water en nauwelijks door-dringbaar voor enzymen.

Zwellen en zure hydrolyse breekt het zetmeel af tot dextrine en vervolgens via het disaccharide maltose naar glucose.

Tabel 1.

Bindingstypen.

Structurele koolhydraten β (α)

hemicellulose	- onoplosbaar - β 1-4, β 1-6	- benutb. herkauwer
cellulose	- onoplosbaar - " , "	- " "
pectine	- oplosbaar - α 1-4,	- algemeen benutb.

Niet structurele koolhydraten α (β)

fructosanen	- oplosbaar - β 2-1, β 2-6	- benutb. herkauwer
zetmeel	- deels oplosbaar - α 1-4, α 1-6	- algemeen benutb.
oligo, di-, en monosaccharide	- oplosbaar - α 1-4, α 1-6	- " "

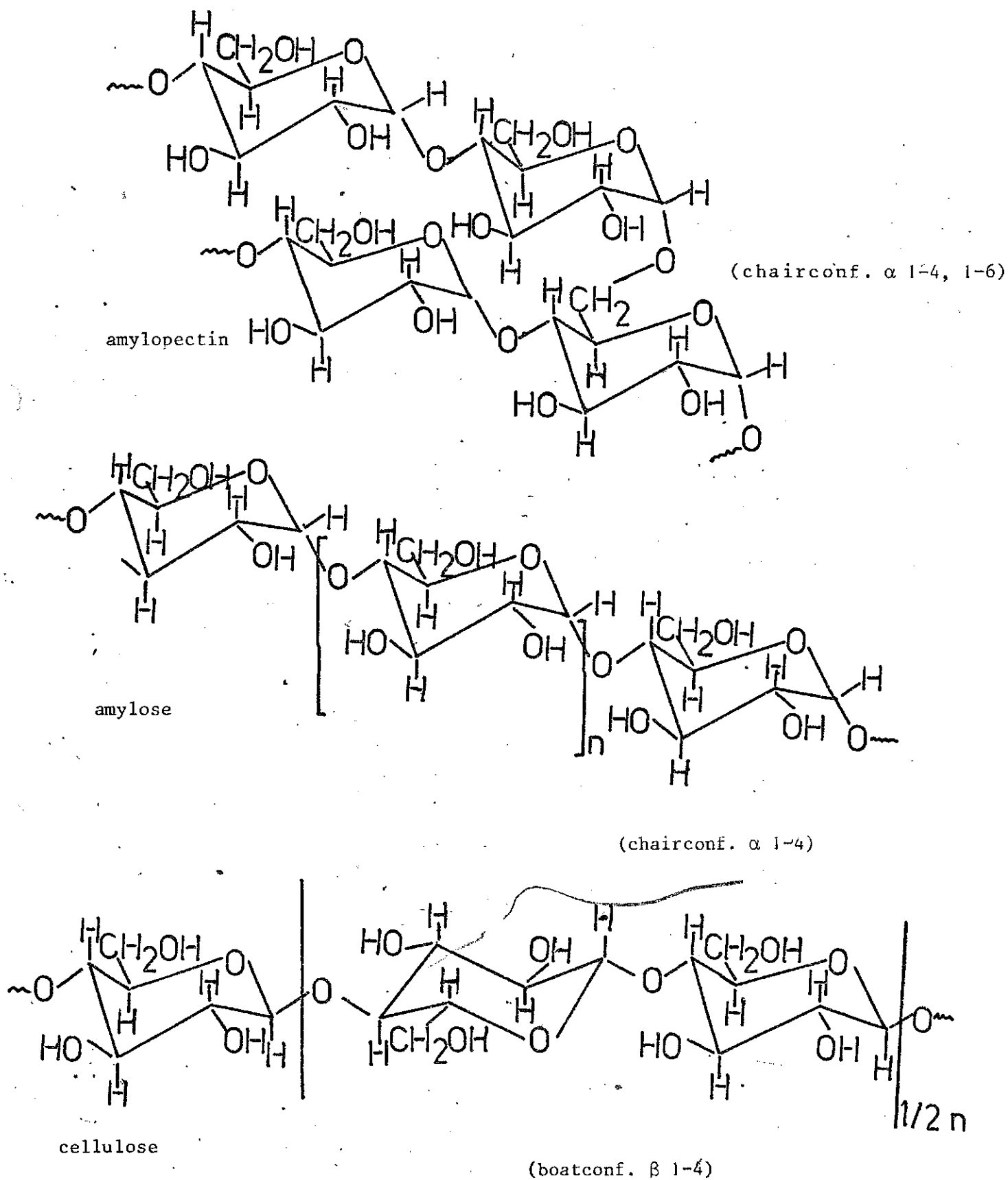


Fig. 2.

De fructosanen zijn oplosbare β - glucoside gebonden koolhydraten en hoewel oplosbaar, dus schijnbaar verteerbaar, kunnen éénmagigen er weinig of niets mee aanvangen.

Van hemicellulose zijn kleine beetjes oplosbaar, dus schijnbaar verteerbaar maar voor de éénmagigen, m.u.v. het paard, onverteerbaar. Dit geldt ook voor cellulose.

BACTERIELE WERKING;

De α -glycoside bindingen kunnen worden gehydrolyseerd door enzymen welke in het maagdarm-kanaal voorkomen van alle landbouw-huisdieren en ook de mens.

Voornamelijk bacteriën en protozoën in de herkauwerpens en in de dikke darm hebben enzymen welke β -glycoside bindingen kunnen hydrolyseren.

Toch zijn ze ook in de wortels van mais-planten aangetroffen.

Door de geringe reikwijdte van die enzymen moet de bacterie in het algemeen via een slijm laag zich aan de vezel hechten terwijl protozoën kleine partikels door zich heen laten stromen en verteren.

B. Morphologie (6,7)

Om over hemicellulose te spreken als homogene groepen verbindingen ook voor wat betreft de aantastbaarheid door bacteriën is een oversimplificatie.

De groepsnaam hemicellulose staat voor zeer veel verschillende verbindingen met voor iedere plant-soort of groeistadium een andere bruto samenstelling. fig.3A.

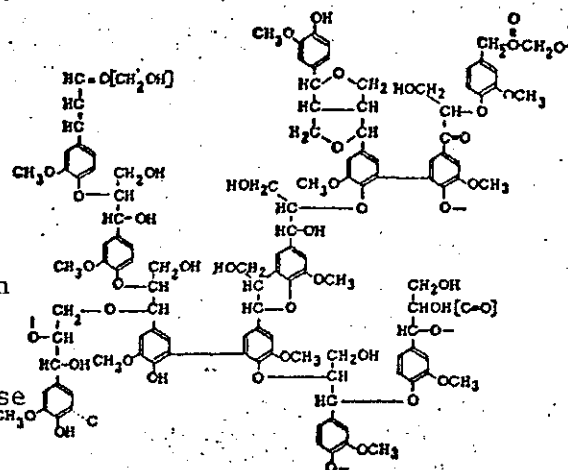
Cellulose verschilt sterk in kristalstructuur waarmee zijn karakter t.a.v. de afbreekbaarheid sterk wordt bepaald. Niet zijn potentiële verteerbaarheid verandert, maar de verteringssnelheid, zodat de snelheid van passage door de voormagen bepalend wordt voor de graad van vertering. Een blokkerende faktor in de vertering van cellulose is lignine, een polyphenylpropyl, maar lignine beïnvloedt de vertering van geblokkeerde celwand niet (fig. 3B). Dit gedrag van lignine, dat in kinetische verteringsmetingen werd gevonden, is moeilijk te verifiëren door toevoegen van lignine omdat deze een gewijzigde chemische structuur heeft. Wel werd in

A Tentative Structure of the Walls of Suspension Cultured Sycamore Cells

From K. Keegstra, K. W. Talmadge, W. D. Bauer and P. Albersheim, *Pl. Physiol.* 51 (1973) 188.

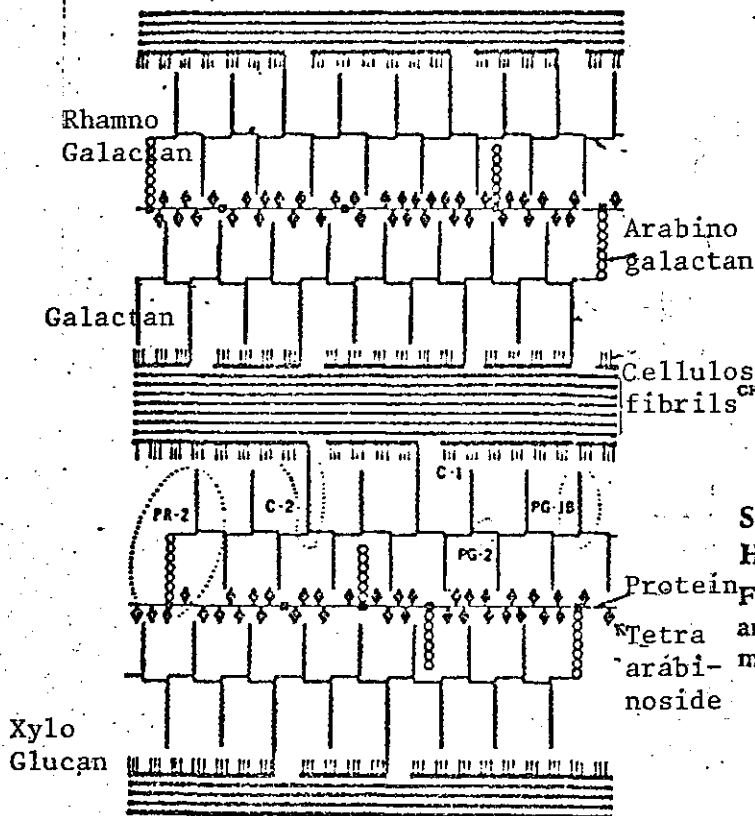
Summary of Structural Units of a Lignin Molecule

From E. Adler, *Das Papier* 15 (1961) 604.

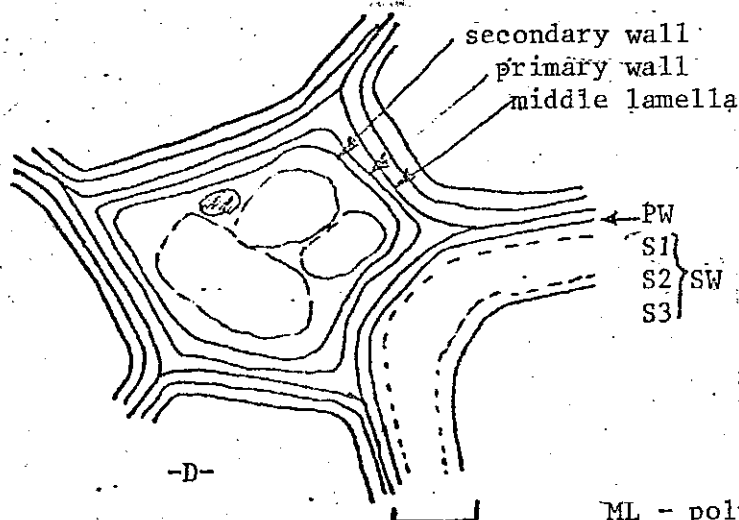


Simplified Structure of the Cell Wall of a Hardwood Fiber.

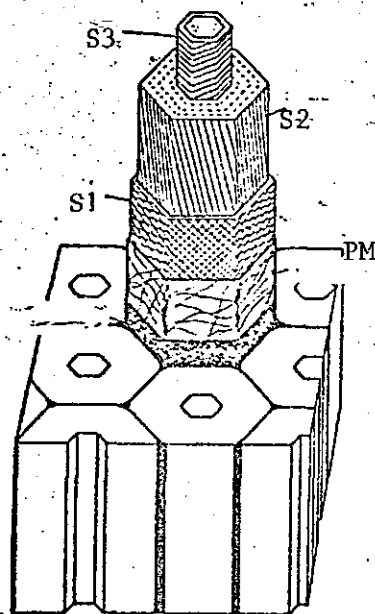
From A. B. Wardrop and D. E Bland in K. Kratzl and G. Bilck (Ed): *Biochemistry of wood*, Pergamon Press (London) 1959.



-A-



-D-



-B-

-C-

ML - poly galacturans + lignine
 PW - cellulose fibrils network
 SW - " " parallel
 - with lignin infiltrated

Fig. 3

"brown-midrebe-maize" een hoog gehalte aan lignine bestanddelen gevonden maar slechts een geringe invloed van lignine op de verteerbaarheid van de cellulose.

In de morphologische structuur in de celwand is aan te wijzen waar lignine zit, zodat de verteerbaarheid varieert met de ontwikkeling van de plant, en de plantdelen. (fig. 3C, D).

We zien dat een deel van het cellulose in een deel van de wand met lignine is vastgelegd. Tussen deze fibrillen zijn de hemicellulosen (fig. 3) in een soort tandrad gekoppeld. Hiermee zijn eiwitten verbonden waarin nogal wat hydroxyproline zit.

Ruwweg kan de relatie tussen plantstructuur en de verdeling in celwand en celinhoud-opbouw weergegeven worden door fig. 4.

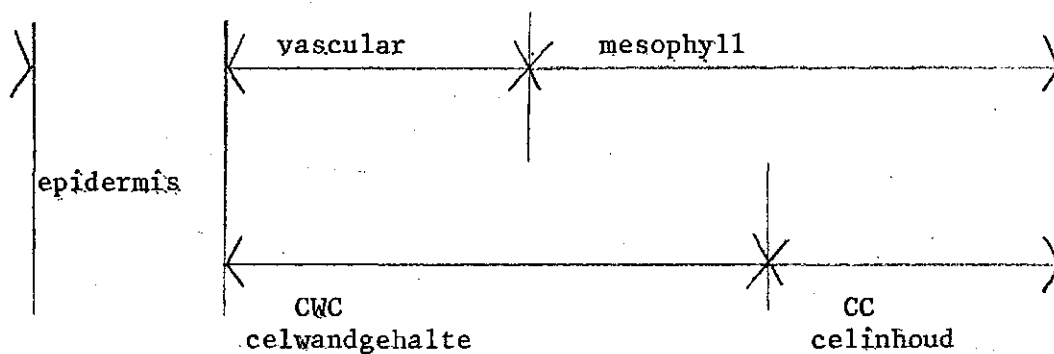


Fig. 4.

Voor de beoordeling van analytische methoden moeten we dus de morphologie van de plant kennen en begrijpen afhankelijk van zijn type, groeiomstandigheden en stadium.

Daarbij moeten we de chemische samenstelling en structuur zoeken en als we dan ook nog de interacties begrijpen kunnen we met voeren beginnen en dan leren hoe het dier ermee omspringt. (13-15).

C Analyse methoden.

Overzicht

De analysemethoden in de veevoeding en de humane voeding beogen bepaalde bestanddelen te bepalen en dat doen ze ook in meer of mindere mate. De waarde van de methoden hangt echter sterk af van de zekerheid een bepaalde komponent geheel te meten. En het is hier waar de problemen verrijzen. Slechts zelden is de gebruikte methode eenduidig en dit betekent dat de interpretatie van de resultaten moeilijker wordt. Hieronder volgt een globaal overzicht van bekende methoden zoals die in tabel 2 zijn gegeven.

De *koolhydraat analyses*: er zijn zeer veel suiker bepalingen beschreven in de literatuur maar in de praktijk is dit terug te brengen tot enkele bepalingen welke in algemeen gebruik zijn. De oplosbare suikers worden geëxtraheerd met 80% of 40% ethanol of koud water. Vervolgens wordt de oplossing geklaard en de suikers gedetekteerd. De internationaal gestandaardiseerde methoden reduceren een koperzout met het suiker en bepalen dan het gevormde koper met atomarie absorptie, electrochemisch, met thio-sulfaat of KMnO_4 dan wel gravimetrisch.

Andere manieren om suiker te bepalen zijn: de draaiing van gepolariseerd licht te meten, het suiker met anthrone te kleuren of enzymatisch om te zetten. De nieuwste en snel in belangrijkheid toenemende methode is de gaschromatografie waar ook tussen verschillende suikers kan worden onderscheiden. Zetmeel wordt bepaald als de met de autoclaaf hydrolyseerbare suikers of met α -amylase te produceren suikers, dus de rest na de suiker-ekstraktie. Na de omzetting in monosacchariden volgt zetmeel de zelfde weg als de suikers. Op de ruwe celstofbepalingen wordt apart teruggekomen. Wat nieuw is, is de Fibertec (fa. Pleuger) een halfautomaat voor de ruwe celstofbepaling.

Een laboratorium met enige ervaring heeft ten minste een zelfde capaciteit. Lignine de binder van de cellulose vezels is moeilijk te bepalen en de bestaande methoden zijn slecht reproduceerbaar.

Ieder van de genoemde bepalingen heeft een ander niveau en bepaalt een ander deel van de aanwezige lignine plus verschillende bijprodukten. De methode volgens v. Soest bepaalt de rest in de ADF na hydrolyse van de cellulose de zgn. Klason lignine (44,45). Deze methode geeft een te lage uitkomst. Een verbetering is door de lignine in de ADF te oxideren met KMnO_4 . Dan blijft de cellulose achter, maar nu worden N-verbindingen meebepaald en tevens een andere lignine pool aangesproken.

Niet alle lignine in de celwand is even toegankelijk.

Tabel 2.

Analyse methoden:

1) Oplosbare suikers (16-29)

Polarimetrisch
Gravimetrisch
Amperometrisch
Oxidimetrisch
Colorimetrisch
Enzymatisch
Gaschromatografie

2) Zetmeel (30-34)

na zure hydrolyse: 1)
na enzym. " : 1)

3) Ruwe celstof (35-41)

NEN 3327
NEN 3326
10 min
peer
Oxidatie Scharrer-Küschner
" v.d. Kamer

4) Lignine (43-48)

Klason 72% H_2SO_4
 $KMnO_4$
Trigol
Acetyl Bromide
GLC/HPLC.

5) Analyse schema's (49-59)

1936-McCance (58)
1945-Williams (58)
1958-Gaillard (51)
1959-Waite (52)
1961-Deriaz (53)
1963-v. Soest (49) (50) (54)
1975-Hellendoorn (55)
1975-Southgate (56) (57) (58)
1977-Englyst (59)

6) In Vitro verteerbaarheid

- Tilley & Ferry (60) (61)
- v. Soest (45)
- enzymmethoden.

De modernere methode van Morrison (46) verlaat het principe van de gravimetrie waarop zoveel landbouwkundige methoden zijn gebaseerd. Deze kolorimetrische methode wordt echter gestoord door aromatische aminozuren en gebruikt het agressieve acetyl bromide als reagens. De trigol methode van Edwards (43) is wat moeilijker te doorzien maar deze berust op de hydrolyse van de lignine bindingen.

Ook hier zullen de fysisch chemische methoden zoals IR, HPLC en GLC in de toekomst de oplossing moeten brengen.

Nu reeds bepaalt Hartley de brokstukken van lignine na hydrolyse met behulp van de gaschromatograaf en verkrijgt zo al vast informatie over de soort groepen. De hogedruk vloeistof chromatografie is in staat om polymeren te scheiden zodat behalve gehalte en samenstelling ook iets over de structuur bekend wordt.

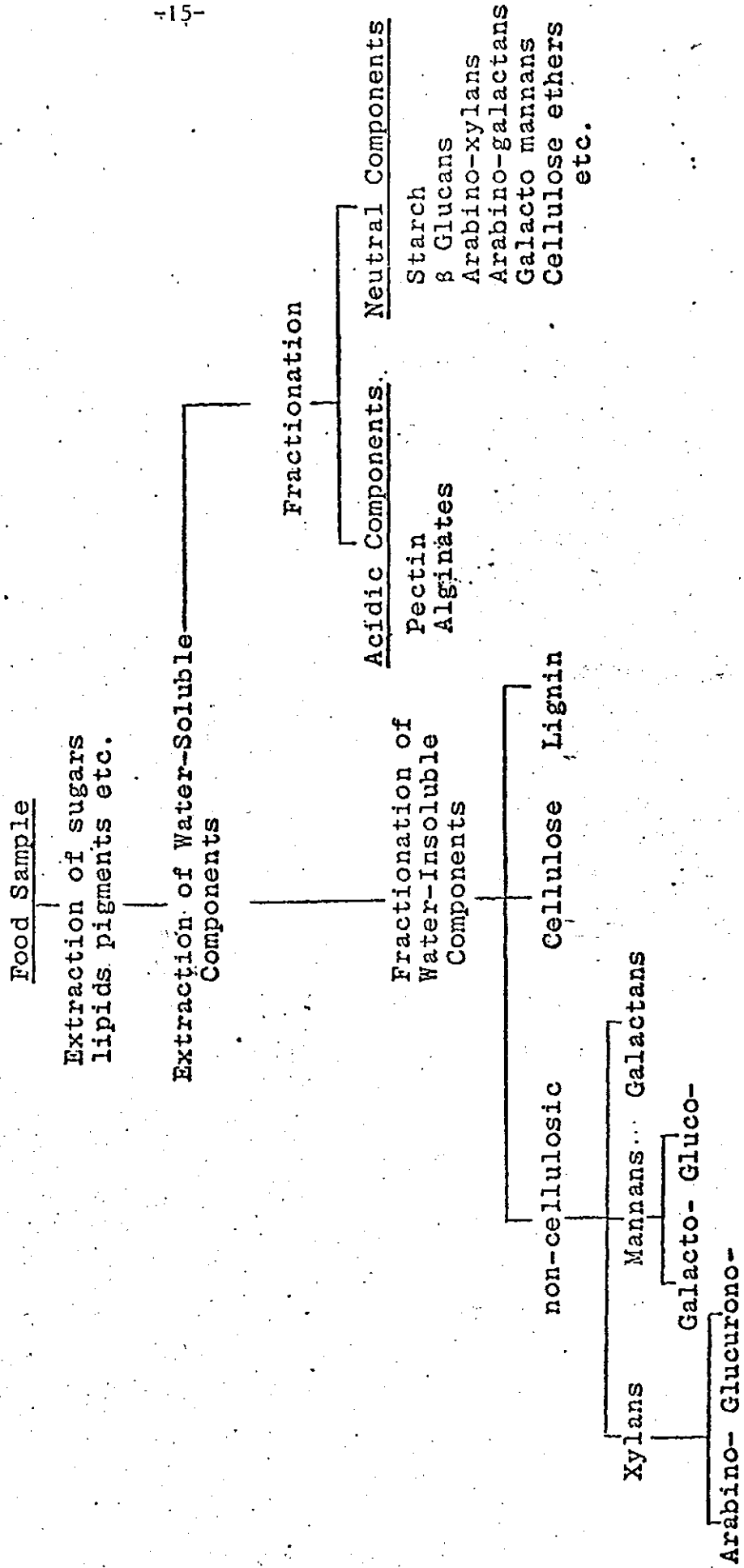
Met Infrarood kan desnoods non-destructief aan de structuur en gehalte van lignine gemeten worden.

Er is veel energie gestopt in *schema's van analyses* voor de fraktionering van de celwand (58). Dat is prachtig voor research doeleinden, maar de laboratorium bezetting zou alleen hiervoor al sterk uitgebreid moeten worden wanneer dit soort fraktioneringen routine matig zouden moeten worden uitgevoerd. Fig. 5 geeft een hypothetisch schema voor de fraktionering. Het liefst zou je dit alles in één stap willen uitvoeren, en die mogelijkheid geeft b.v. Infraroodreflectie. Zo lang die techniek nog niet buiten de USA uitvoerbaar is zal waarschijnlijk alleen gaschromatografisch iets te doen zijn, zoals verderop wordt getoond. Tot in welke gedetailleerdheid gescheiden moet worden hangt af van de vraagstelling. Voor voederwaardering zou kunnen worden volstaan met de analyseketen voor koolhydraten: voedselmonster → oplosbare suikers → water oplosbare componenten → water onoplosbare componenten (cellulose, niet cellulose, lignine), eventueel uitgebreid met geblokkeerde en vrije cellulose en niet cellulose.

Reeds in de scheiding van oplosbare suikers/zetmeel beginnen de moeilijkheden (23).

Zolang er niet al te belangrijke konklusies aan de analyse uitkomst worden verbonden kan wat in kokende 40% ethanol oplost suiker worden genoemd en wat in kokend water oplost, zetmeel. Maar de zetmeel moet eigenlijk bij 120° C worden opgelost om amylopectine vrij te krijgen.

Fig. 5 Hypothetical Scheme for Complete Fractionation of All Polysaccharides



Each fraction characterised by degree of polymerisation, branching and methylation of pectic components.

In 1936 werd door McCance (fig.7) een scheiding aangebracht tussen oplosbare en niet oplosbare koolhydraten, een benadering welke wel voldoet voor éénmagigen. In 1942 kwam Williams (fig.8) met een schema waaraan door Hellendoorn en Southgate niets belangrijks werd toegevoegd.

Van Soest sloeg met de detergenten een werkelijk nieuwe weg in. Maar ook hier wordt nog niet eenduidig de componenten bepaald.

Het jongste fraktioneringsschema van Englyst heeft kansen.

Ook hij onderscheidt een aantal scheidingsstappen, maar iedere fraktie wordt met de zelfde gaschromatografische methode bepaald. Hier wordt dus naar uniformering van handelen gestreefd, verder is de GC-bepaling relatief vlug. Nu nog een goede aanpak van de fraktiescheiding en er ligt een *redelijk alternatief voor de koolhydraat bepaling.*

De ontwikkelingen in denken wordt in vogelvlucht getoond in de volgende figuren:

fig. 6 1936 Unavailable carbohydrates voor éénmagigen met name de mens.

fig. 7 1942 Volledig schema dat daarna niet meer wezenlijk is veranderd.

In 1958 heeft Gaillard de methode in zo verre verfijnd dat de gravimetrische methode werd omgewerkt naar een spectrofotometrische bepaling.

fig. 8 Van Soest kwam met iets nieuws; de detergenten.

Hiermee werd een nieuwe conceptie gegeven van de celwand.

Gaillard heeft ook deze methode verfijnd met spectrofotometrische bepalingen.

Om aan te tonen hoe verschrikkelijk veel werk die zgn. moderne

fig. 9 filosofie kost de methode volgens Southgate. Deze ontwikkeling is heilloos.

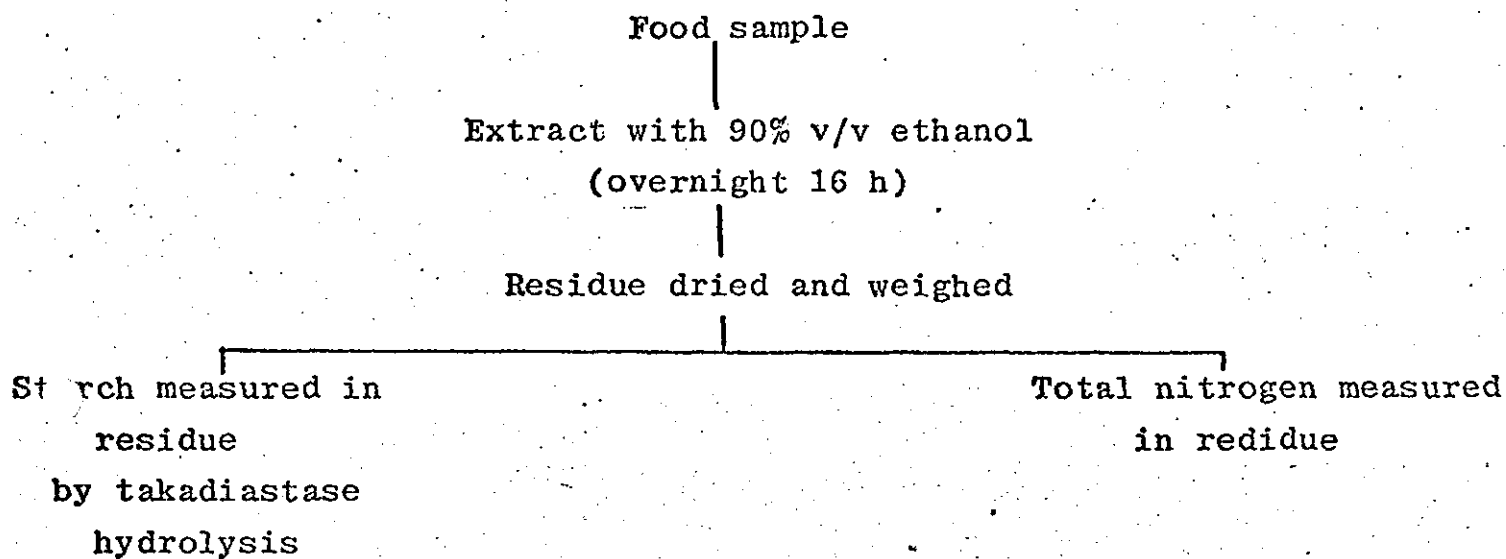
Handig voor research doeleinden maar onmogelijk voor praktische doeleinden. Mijn voorkeur gaat uit naar de methode van Englyst.

fig. 10 Deze is nog niet praktisch genoeg maar ik geloof dat de tussenoplossing voor onze analyseproblemen hier gezocht moeten worden.

Een zo eenvoudig mogelijke scheiding, zo gelijkvormig mogelijke hydrolyse en vervolgens één soort gaschromatografische analyse.

Deze gedachte verdient tenminste een verdere uitwerking.

Fig.6 Stages in the measurement of unavailable carbohydrate
(McCance, Widdowson and Shackleton, 1936)



Unavailable carbohydrate $\equiv$ residue insoluble in alcohol - (starch + total N x 6.25)

Fig.7 Stages in the measurement of indigestible residue
(Williams and Olmsted, as modified
by Macy 1942)

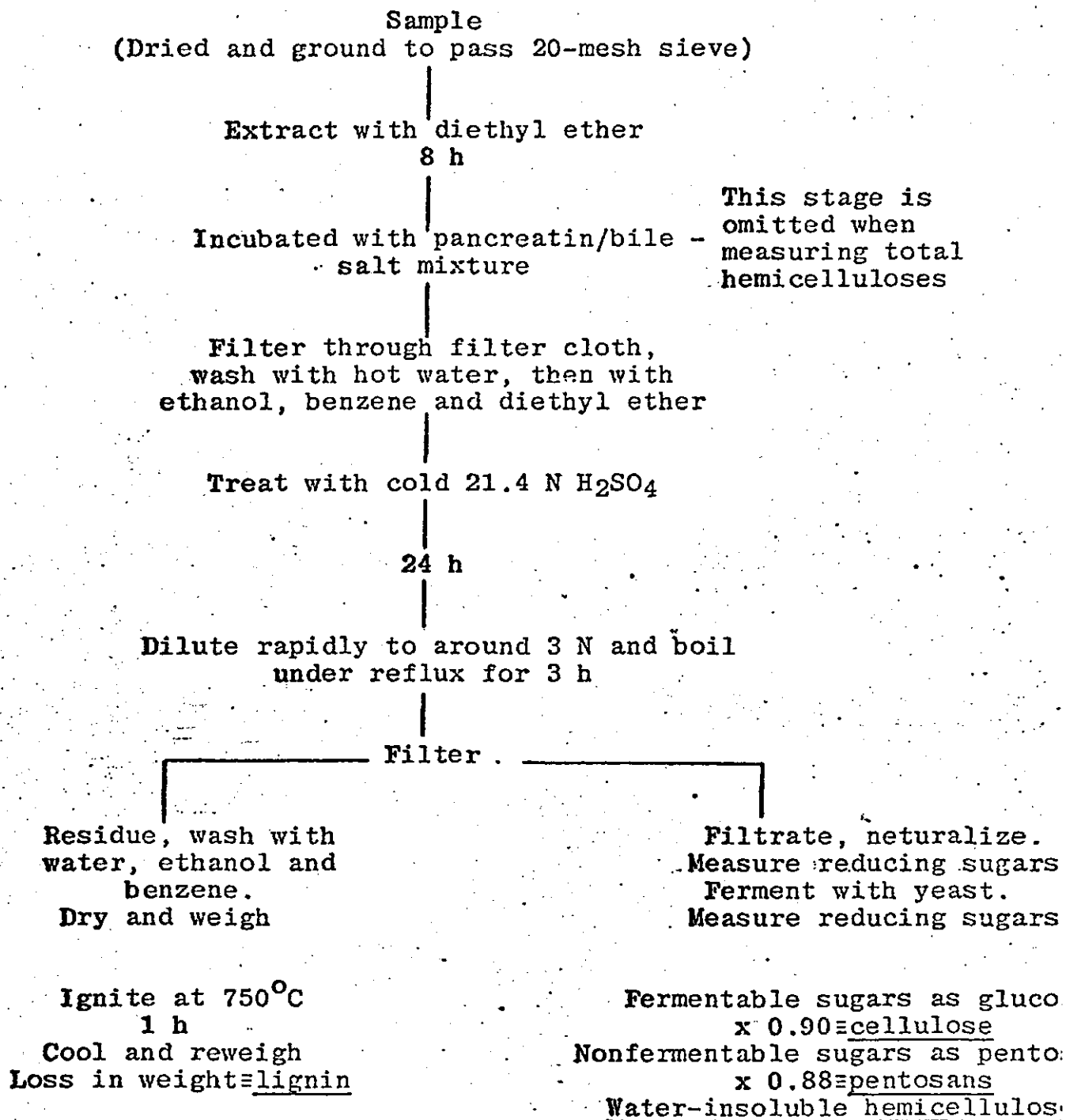


Fig. 8

Summary of the Stages in the Acid-
Detergent Fibre Method

Air-dry or Fresh Sample

Boil under reflux in 0.5M H_2SO_4
containing 20g CTAB/litre
(1g sample/100ml)
60min

Filter, wash with hot water,
then acetone

Dry and weight residue

ADG = residue

Summary of the Stages in the Neutral-
Detergent Fibre Method

Air-dry or Fresh Sample

Treat with amylase

Boil under reflux in buffered
SLS solution (30g/litre)
(0.5-1g sample/100ml)
60min

Filter, wash with hot water,
then acetone

Dry and weigh (Treat with amylase)

Ash and re-weigh Modified NDF

NDF = loss on ignition

Fig. 9 The Fractionation of the Plant Cell Wall (Southgate, 1975; after Siegel 1968)

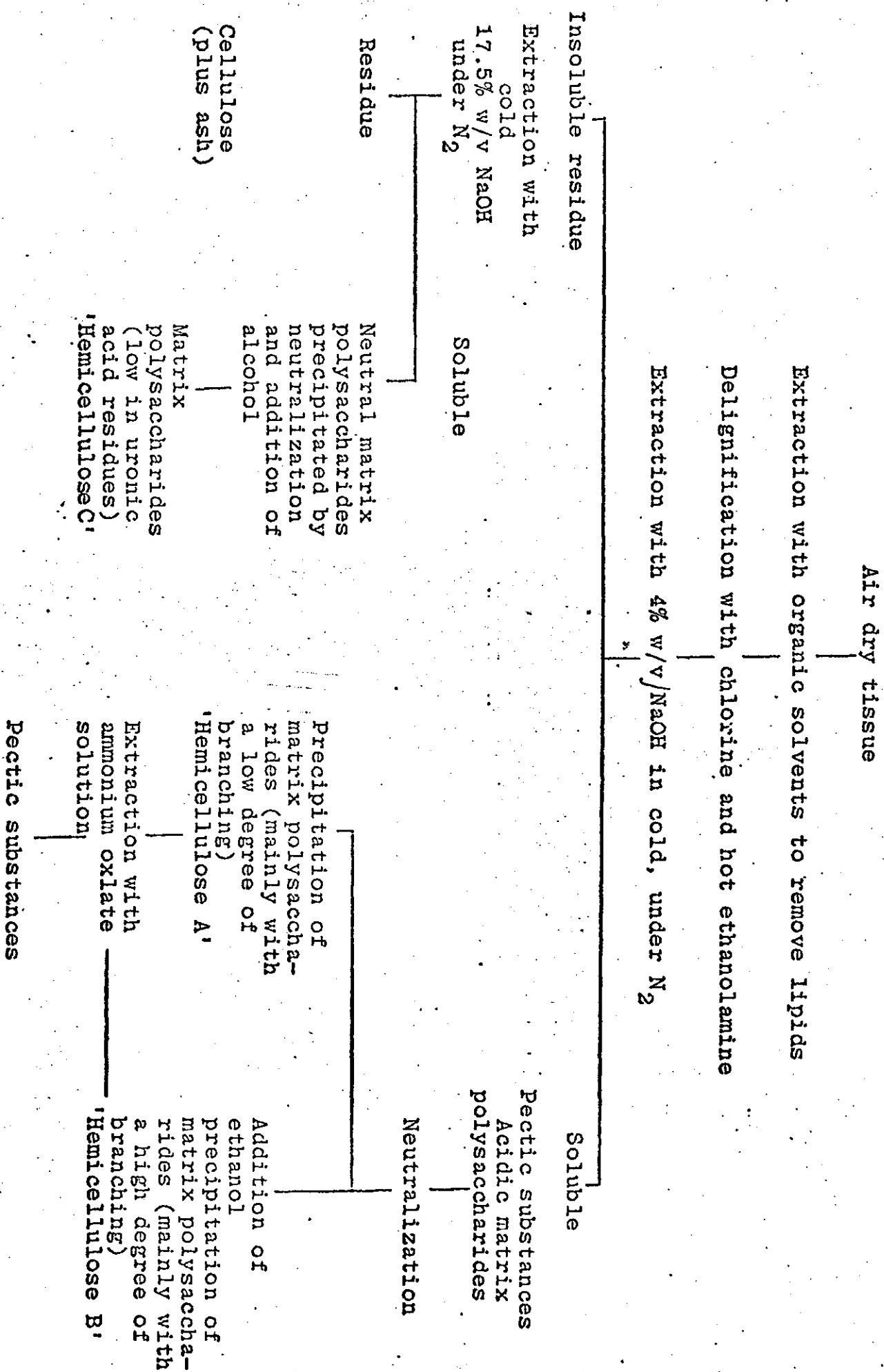


Fig. 10 Englyst procedure for analysis of free sugars, starch and non-cellulosic polysaccharides.

Food Sample

(100mg freeze-dried)

Extract with 20ml acetate buffer
(0.2M; pH 5.0) 5h at 90°C

1ml aliquot
Measure free sugars
by G.L.C.

Add 0.1ml amyloglucosidase
(1mg/ml in acetate buffer)
Incubate 16h at 45-48°C

Supernatant

Residue

Suspend in 20ml Centrifuge

Remove 18ml of supernatant

Add 1ml standard and

3ml 4N Trifluoroacetic acid

Hydrolyse 1h at 121°C

Measure free sugars - G.L.C.

WATER INSOLUBLE NON-CELLULOSIC

HEXOSES and PENTOSEs

4ml

Add 16ml ethanol centrifuge;
wash ppt. with 90% $\frac{v}{v}$ ethanol

Dry residue add 1ml 2M Trifluoro-

acetic acid (with internal

Standard)

Hydrolyse 1h at 121°C

Measure free sugars G.L.C.

WATER-SOLUBLE NON-CELLULOSIC

Take 1ml

Measure free sugars

G.L.C

Increase in glucose

= STARCH

4ml

Precipitate with ethanol

Hydrolyse ppt with 5ml

0.5M H_2SO_4 2.5h at 100°C

Uronic acids (carbonate)

URONIC ACIDS

IN WATER-SOLUBLE FRACTION

Keuzegroep in verband met doel.

In figuur 11 wordt een poging gedaan het analysepakket af te stemmen op het gewenst doel (62).

Het *in vivo* verteerbaarheids onderzoek steunt geheel op de Weende analyse. (het onderste deel van de figuur). De onzekerheid in de uitkomsten van de analyses wordt gesommeerd teruggevonden in de waarde voor NFE. De belangrijkste bron voor die onzekerheid is de ruwe celstof.

Voor de *berekening van de verteerbaarheid* uit de chemische analyses kan b.v. gebruik worden gemaakt van de detergent methoden van Van Soest. (midden in de figuur).

Wat we eigenlijk wensen gebeurt enigszins met de "in vitro" verteerbaarheidsmethode. Zo als aangegeven (bovenste deel van de figuur) wordt in één meting de grens bepaald tussen verteerbaar en onverteerbaar. Jammer genoeg is die lijn erg dik en methoden om die onzekerheid terug te brengen zijn nog niet bekend. Wel zijn nu enzymatische methoden ontwikkeld maar die zijn nog lang niet zo goed als de "in vitro".

Oplosbaarheid structurele koolhydraten.

De oplosbaarheid van de verschillende voedingsbestanddelen is steeds pH-afhankelijk (42,62) (Fig. 12).

De ruwe celstof (39,40) wordt verkregen door hydrolyse met achtereenvolgens verdund zuur (pH 0,4) en verdund loog (pH 13,5) zodat eerst een deel van het eiwit en hemicellulose oplost en vervolgens de rest van het eiwit, de hemicellulose en een variabel deel van de lignine.

Ook de van Soest methoden (45) maken gebruik van deze oplosbaarheden. Neutraal detergent, dodecylhydrogensulfaat, lost bij pH 7 alles op behalve de celwand bestanddelen.

De zure detergent, cetyl tetraammoniumbromide in 0,5N H_2SO_4 , lost bij pH 0,7 alles op behalve cellulose en lignine.

Dan blijft nog over om te scheiden cellulose + lignine, waarvan cellulose in 72% H_2SO_4 , pH-1, wordt gehydrolyseerd.

Bij verwijdering van lignine i.p.v. cellulose wordt $KMnO_4$ als oxidator gebruikt.

Hydrolyse, Oxidatie, Reduktie.

In de plantencelwand zijn zeer vele verschillende bindingsvormen te onderscheiden welk ieder op eigen wijze verbroken moeten worden (11).

De tabel 3 geeft een overzicht van de vele soorten "Cleavages" welke toegepast kunnen worden op aan lignine gekoppelde koolhydraten.

De keuze van de kraak methode bepaalt de aard van de produkten welke worden gevonden.

OPLOSBAAR KOOLHYDRATEN				VERTEERBAAR		LIGNINE		ONVERTEERBAAR		CUTINE	SILICIUM
RUW EIWIT				HEMICELLULOSE		HEMICELLULOSE		HEMICELLULOSE			
ETHER EKSTRAKT				CELLULOSE		CELLULOSE		CELLULOSE			
VOLLEDIG VERTEERBAAR				ONVERTEERBAAR							
CELINHOUD 44%				CELWAND 56%							
RUW EIWIT	AS	8%	2%	ORG. ZUREN	OPL. KOOLEHYDR	HEMICELLULOSE	LIGNINE	CELLULOSE	25%	RUWE CELSTOF	
15%				10%	9%	26%	5%				
RUW EIWIT	AS	N-VRIJ EKSTRAKT									
		RUW VET									

FIG 11 DE RELATIE TUSSEN ANALYSES EN SAMENSTELLING VAN RUWVOEDERS.

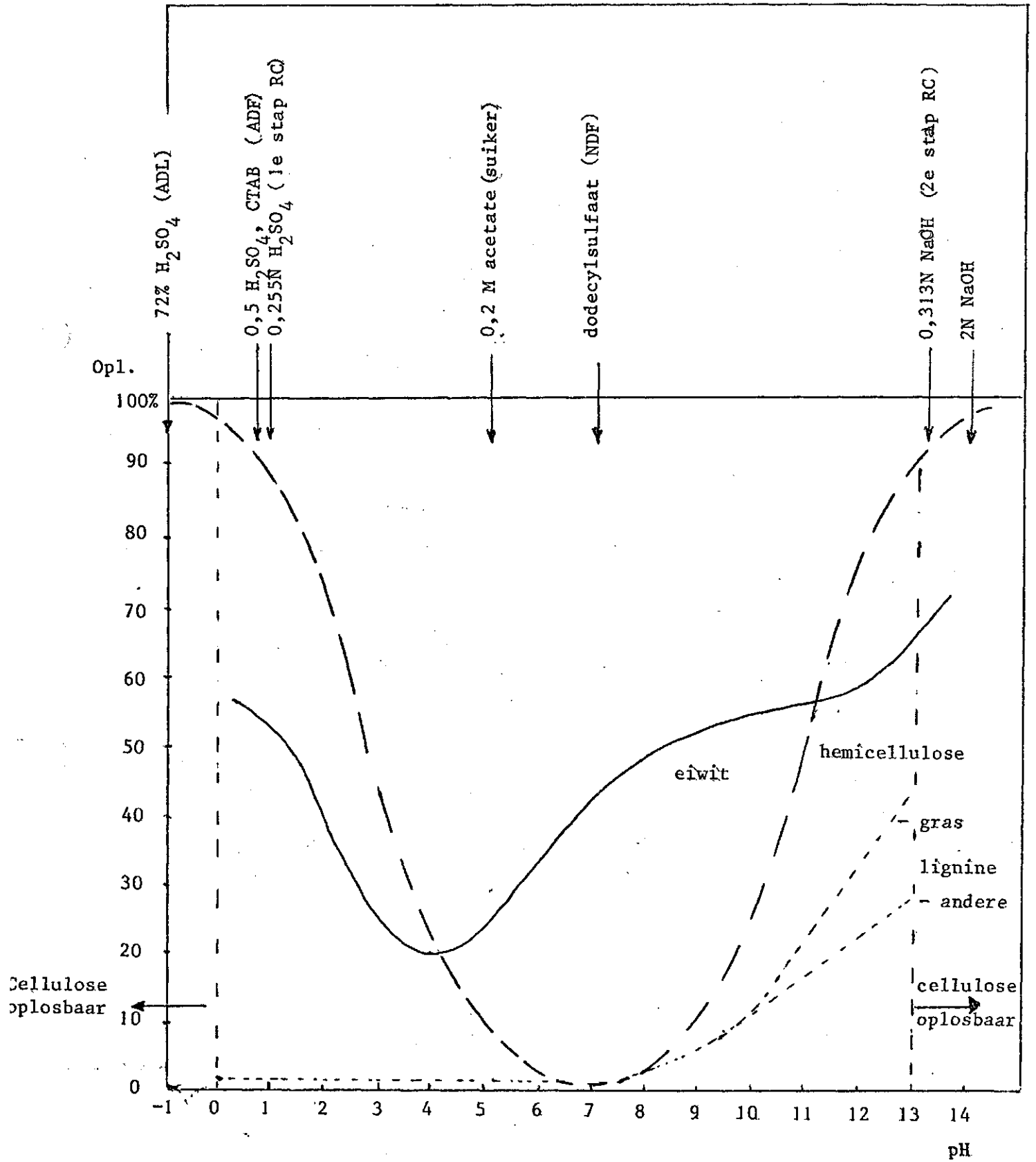


Fig. 12

Tabel 3.

Solvolysis by acids and basis.

A.F.A. Wallis chapt. 9 Lignines Willy Interscience.

ACID SOLVOLYSES

A. Mild acid hydrolysis

B. Hydroxyl displacement

- 1) Introdution alkoxy group 8
- 2) Mercaptolyse
- 3) H₂O elimination

C. Solvolytic ether cleavages

- 1) α -ether cleavage
- 2) β -ether cleavage

D. Solvolytic C-C cleavages

- 1) β - γ -cleavage
- 2) α - β -cleavage

E. Side chain rearrangements

BASIC SOLVOLYSES.

A. Solvolytic ether cleavages

- 1) α -ether cleavage
- 2) β -ether cleavage
- 3) diaryl ether cleavage
- 4) methoxyl group cleavage

B. Solvolytic C-C cleavages

- 1) β - γ -cleavage
- 2) α - β -cleavage
- 3) α -I-cleavage
- 4) cleavages at high temperatures.

D Ruwe Celstof

Er zijn nogal wat verschillende ruwe celstof bepalingen ontwikkeld en zij geven ieder een ander resultaat. De belangrijkste redenen voor hun ontwikkeling zijn vereenvoudiging, versnelling en eenduidiger resultaten.

Ruwe celstof omvat ca 90% van de cellulose, ca 60% van de lignine en ca 10% van de hemicellulose van de planten celwand. De preciese verhoudingen hangen in belangrijke mate af van de aard van het plantaardige materiaal en de gekozen methode.

NEN 3327 - SCHARRER KUSCHNER. (69).

In de Crude fibre werkgroep van de *International Organisation for Standardisation* (ISO) werd de gravimetrische RC bepaling volgens Weende (ISO/TC34/N697 ongeveer gelijk aan NEN 3327) vergeleken met de methode volgens Scharrer-Küschner (37).

In de NEN methode wordt achtereenvolgens met zwavelzuur en loog gekookt, terwijl volgens de Scharrer methode met een mengsel van azijnzuur, salpeterzuur en trichloorazijnzuur wordt gekookt.

De NEN methode is voor ruwvoerders ontwikkeld, Scharrer voor graanprodukten met in de regel een laag ruwe celstofgehalte.

In figuur 13 zijn de resultaten van 5 nederlandse laboratoria weergegeven. De geanalyseerde grondstoffen zijn; cornglutenmeel, rijstemeel, gerste meel, tapioca meel en soyabonen meel, waarvan de laatste een grote bron van variantie is. In de figuur wordt gelijkheid van de resultaten met beide methoden gesuggereerd maar de korrelatie vergelijking zonder sojabonenmeel, is:

$$NEN = 1,15 * Scha.Kü - 0,43 \quad r^2=0,83 \quad N=20 \text{ ruwe celstof : 1-5\% in ds}$$

Voor een viertal voeders met een ruwe celstofgehalte van ongeveer 5% vonden de engelsen:

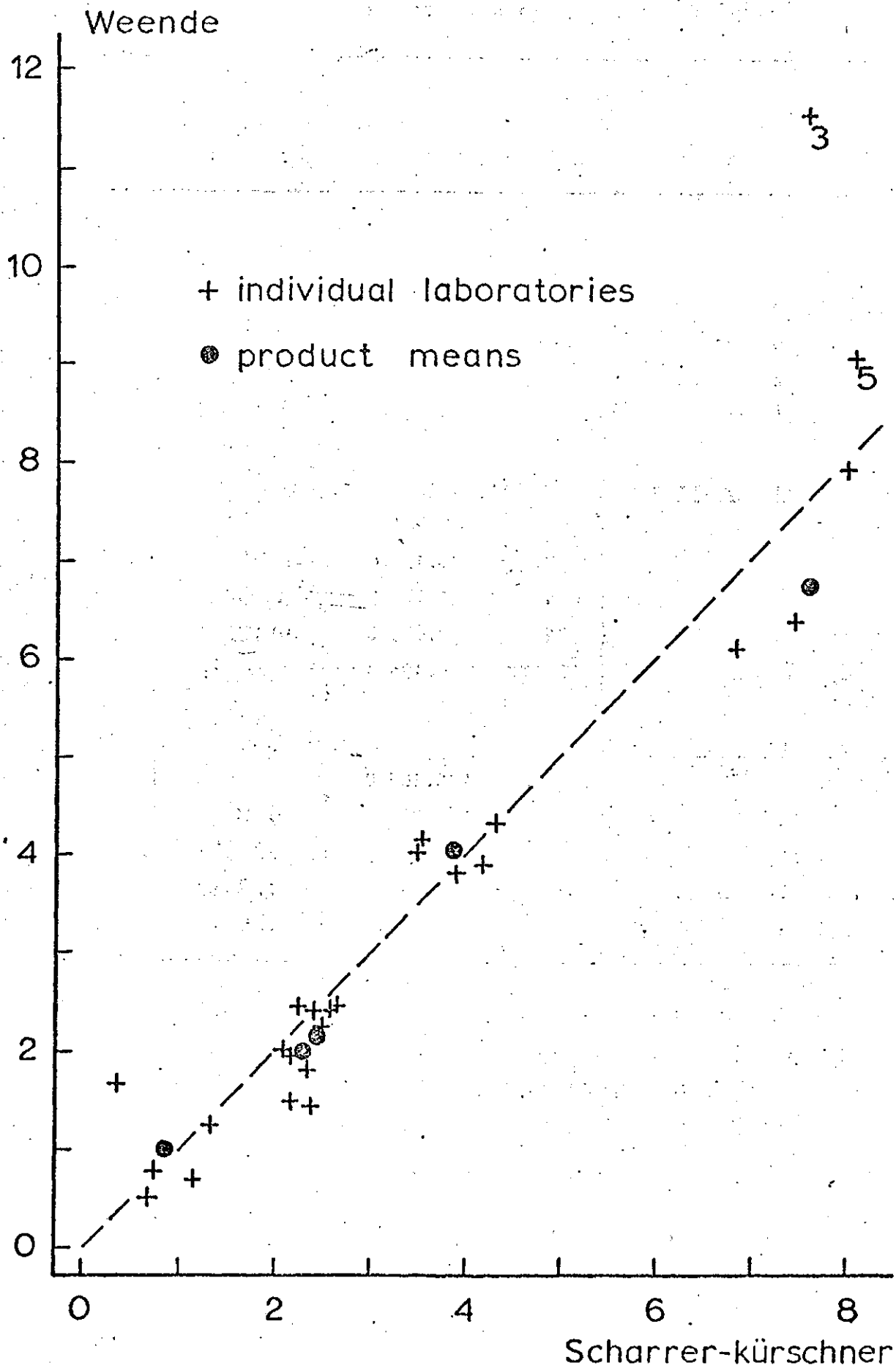
$$NEN = 1,15 * Scha.Kü - 0,43 \quad r^2 = 0,97 \quad N=4$$

In tabel 4 (69) staan de resultaten van czechoslovakia voor een groot aantal produkten.

Granen :	NEN = 1,06 * Scha.Kü - 0,16	$r^2=0,98$	N = 30	ruwe celstof: 2-10% in ds.
Stro :	NEN = 1,03 * Scha.Kü - 0,70	$r^2=0,94$	N = 4	" " 45% in ds.
Hooi :	NEN = 1,02 * Scha.Kü + 0,62	$r^2=0,98$	N = 7	" " 22-32% in ds.
Grassen:	NEN = 1,08 * Scha.Kü - 0,63	$r^2=0,96$	N = 48	" " 17-38% in ds.
Silages:	NEN = 1,15 * Scha.Kü - 1,63	$r^2=0,96$	N = 10	" " 10-38% in ds.

Het zal duidelijk zijn dat voor geen enkel niveau deze waarden aan elkaar gelijk zijn, evenals dat er voor verschillende produkten verschillende relaties bestaan.

Fig.13. Report No.75 Inst. for Cereals Flour and Bread T.N.O.
A comparison of the Weende and the Scharrer-Kürschner procedures
for the determination of crude fibre in animal feeding stuffs.



ISO/TC34/SC10 N100 (Czechoslovakia).

TABLE (4) : Comparison of crude fibre content values obtained by two different methods. (Results of the Weende procedure were used as a reference values).

Abbreviations : Sch-Kü = Scharrer-Kürschner procedure

Plant material	crude fibre content in		differences	
	%		between contents	
	Weende	Sch-Kü	% abs.	% rel.
I. STRAWS				
wheat straw	48.02	46.97	1.05	2.18
rye straw	44.55	43.63	0.92	2.06
oats straw	45.98	45.78	0.20	0.43
barlex straw	47.54	46.98	0.56	1.18
II. Meadow hays of different				
quality and botanical composition				
	32.64	31.62	1.02	3.12
	30.28	29.38	0.90	2.97
	29.34	27.32	2.02	6.88
	28.51	27.56	0.95	3.33
	27.42	26.64	0.78	2.84
	26.59	25.16	1.43	5.38
	22.24	21.35	0.89	4.00
III. GRASSES or FORAGE PLANTS				
Timothy grass (Phleum pratense)				
	38.10	37.14	0.96	2.52
	29.15	27.99	1.16	3.98
	27.39	26.45	0.94	3.43
	25.81	24.97	0.84	3.25
	23.15	22.42	0.73	3.15
Orchard grass (Dactylis glom.)				
	32.37	31.39	0.98	3.03
	28.20	27.43	0.77	2.73
	23.13	22.28	0.85	3.67

Plant material	Weende	Sch-Ku	% abs.	% rel.
<u>Meadow fescue (Festuca pratensis)</u>	31.25	30.27	0.88	2.82
	25.39	24.57	0.82	3.23
	23.42	22.54	0.88	3.76
<u>Red fescue (Festuca rubra)</u>	30.65	29.85	0.80	2.61
	28.18	27.43	0.70	2.49
	26.18	25.36	0.82	3.13
	24.18	23.21	0.97	4.01
	22.96	21.98	0.98	4.27
<u>Italian ryegrass (Lolium multiflorum ssp. italicum).</u>	27.86	27.04	0.82	2.94
	23.95	23.00	0.95	3.97
	22.36	21.35	1.01	4.52
	17.64	17.04	0.60	3.40
<u>Lucerne (Medicago sativa)</u>	30.38	27.52	2.86	9.41
	28.19	25.78	2.41	8.55
	26.39	23.67	2.72	10.31
	23.35	22.47	0.88	3.77
	22.45	21.53	0.92	4.09
	21.44	20.61	0.83	3.87
	21.35	21.14	0.21	0.98
<u>Red clover (Trifolium pratense)</u>	26.11	24.26	1.85	7.08
	25.51	24.49	1.02	4.00
	24.64	23.58	1.06	4.30
	23.62	22.92	0.70	2.96
	22.44	21.46	0.98	4.37
	22.30	21.68	0.62	2.78
	21.66	20.61	1.05	4.85
	20.30	19.41	0.89	4.38
maize-bread bean mixture	27.39	26.09	1.30	4.75
lucerne-clover mixture	26.27	25.96	0.31	1.18

Plant material	Weende	Sch-Kü	% abs.	% rel.
lucerne-oats mixture	26.76	26.19	0.57	2.13
mixture of various grasses	25.77	25.05	0.72	2.79
Lucerne-grass mixture	24.10	23.10	1.00	4.15
lucerne-oats mixture	22.51	21.18	1.33	5.91
sudan grass	29.63	28.85	0.78	2.63
wheat plants	29.54	27.34	2.20	7.45
rape plants	28.92	26.28	2.64	9.13
broad bean plants	31.67	28.68	2.99	9.44
" " "	30.25	28.95	1.30	4.30
" " "	25.67	23.98	1.69	6.58
" " "	20.72	20.33	0.39	1.88

IV. HAYLAGES

27.10	26.20	0.90	3.32
26.22	25.20	1.02	3.89
20.21	18.51	1.70	8.41

V. SILAGES

maize	34.82	30.84	3.98	11.43
maize	32.23	31.33	0.90	2.79
maize	31.72	31.36	0.36	1.13
maize	24.41	23.69	0.72	2.95
maize	20.49	20.35	0.14	0.68
sugar beet tops and leaves	23.53	19.27	4.26	18.10
" " " " "	18.22	17.04	1.18	6.48
" " " " "	11.12	10.52	0.60	5.39
" " " " "	10.68	10.56	0.12	1.12
maize + sunflower + mustard + + sugar beet pulps	38.32	32.34	5.98	15.60

Plant material	Weende	Sch-Kü	% abs.	% rel.
<u>VI. CEREALS</u>				
wheat	2.25	2.59	0.34	13.12
	2.64	2.10	0.54	20.45
	2.21	2.19	0.02	0.90
	1.93	2.21	0.28	12.67
	2.03	1.95	0.08	3.94
	1.89	1.64	0.25	13.23
	1.96	1.70	0.26	13.26
	1.79	1.49	0.30	16.76
rye	2.06	2.19	0.13	5.94
	1.93	1.90	0.03	1.55
	1.86	1.75	0.11	5.91
	2.14	2.09	0.05	2.34
	1.97	1.82	0.15	7.61
barley	1.96	1.91	0.05	2.55
	4.47	4.21	0.26	5.82
	3.88	4.05	0.19	4.69
	4.41	4.32	0.09	2.04
	4.32	4.21	0.11	2.54
	4.01	3.96	0.05	1.25
	3.92	3.89	0.03	0.76
	4.56	4.64	0.08	1.72
	4.40	4.38	0.02	0.45
	3.60	3.97	0.37	9.32
oats	3.71	4.90	1.19	24.28
	10.31	9.93	0.38	3.68
	10.06	9.85	0.21	2.09
	9.59	9.41	0.18	1.88
	9.19	7.98	1.21	13.17
	9.28	8.88	0.40	4.31
	9.54	9.06	0.48	5.03

NEN 3327 - NEN 3326

NEN 3327 wordt beschouwd als de referentie methode, terwijl NEN 3326 als routine methode geschikter is. Het verschil tussen deze methoden is dat bij 3327 tussen het koken met zuur en loog gefiltreerd wordt, en bij de verkorte methode na het koken met zuur een overmaat loog wordt toegevoegd en vervolgens het koken wordt voortgezet. Van deze zgn. "verkorte methode" (3326) zijn nogal wat modificaties in gebruik, met als gevolg onderlinge verschillen. Voor een zestal laboratoria in Nederland werden de volgende resultaten gevonden:

- de 10 onderzochte monsters zijn 2x gras, pulp, 3x krachtvoer, stro, hooi, snijmaïs en A.brok.
- de ruwe celstofgehalten lagen tussen de 8 en de 46%.

Regressievergelijkingen: $NEN3327 = a * NEN3326 + b$.

Laboratorium	1	2	3	4	5	6	Gem.
Regr.coeff.a=	1.027	1.053	1.020	1.003	1.007	1.038	1.013
Constante b=	-0.856	-2.282	2.148	0.319	-0.312	0.665	0.320
Corr. : r^2 =	0.999	0.994	0.995	0.998	0.998	0.998	0.987
R.st.afw. =	1.232	3.709	6.052	1.847	2.177	1.722	93.180
Aantal:N =	100	30	100	100	80	80	490

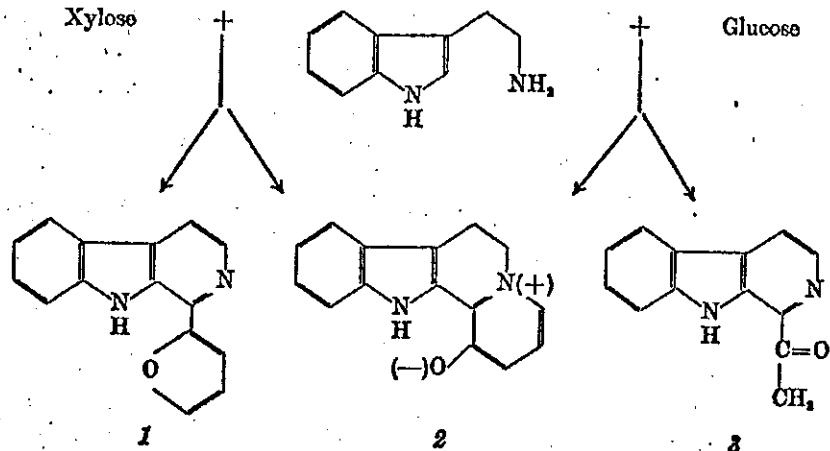
De verschillen komen voort uit de verwarmingsmethoden en de verwarmings-tijden. Ook blijken deze methoden persoonsgebonden te zijn, dat wil zeggen dat reeds kleine verschillen in de behandeling tot verschillen aanleiding kan geven.

ADIN- MAILLARD - TANNIN - HYDROXY PROLINE.

Onder invloed van verhoogde temperaturen blijken er bij ruwvoerders *Maillard* (63, 66) *reactieprodukten*, verbindingen van suikers met eiwitten, te worden gevormd. Dus de monsterbehandeling, d.w.z. de droogtemperatuur, speelt een rol, maar deze reactie produkten kunnen in geringere mate ook al aanwezig zijn in het oorspronkelijke materiaal.

Enkele reactie produkten zijn in fig. 14 weergegeven.

In fig. 15 a en b wordt de invloed van de droogtemperatuur op de vorming van "*acid detergent insoluble nitrogen*" gegeven, waarbij het vochtgehalte zeer van invloed lijkt te zijn.



Maillard reaktie produkten
van Tryptofaan

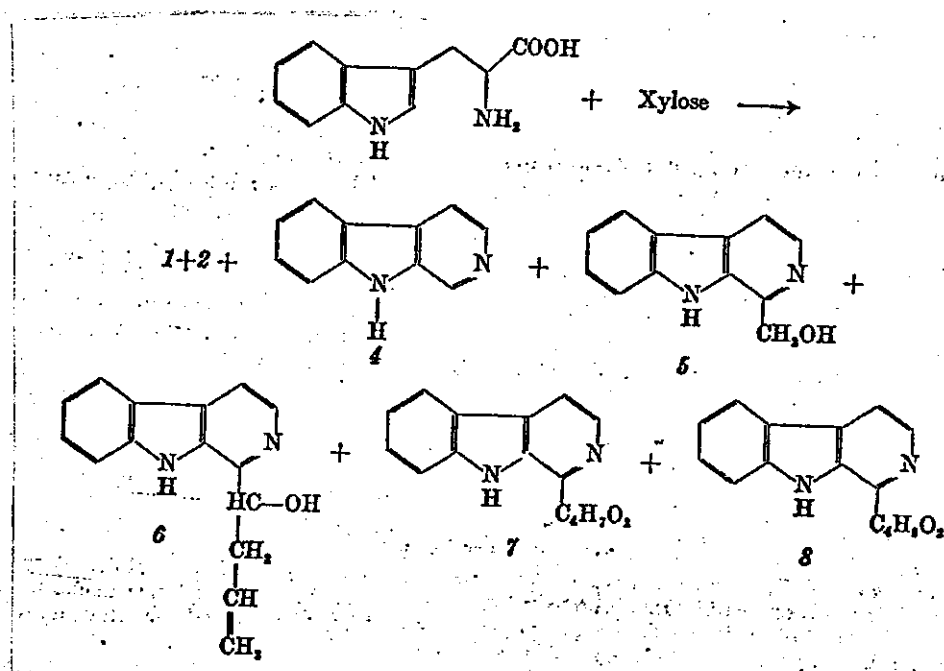


Fig. 14

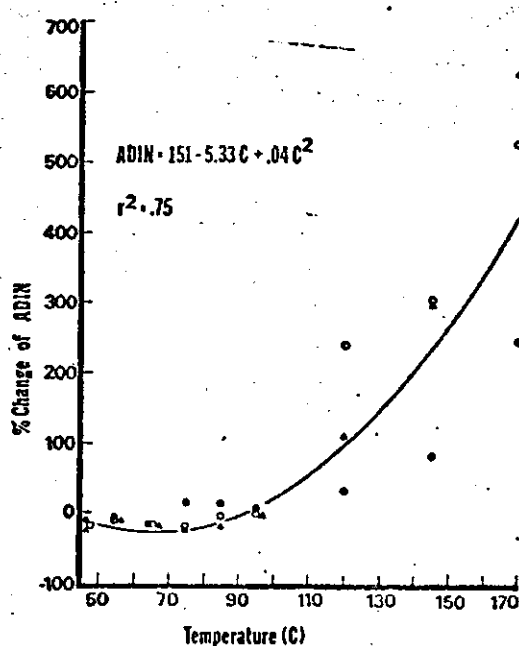


FIG. 15a Relationship between temperature and quantitative changes of acid-detergent insoluble nitrogen (ADIN) in heated dry samples (N=27, 9 samples/forage). (▲) Alfalfa leaves. (○) Alfalfa hay. (●) Alfalfa stems.

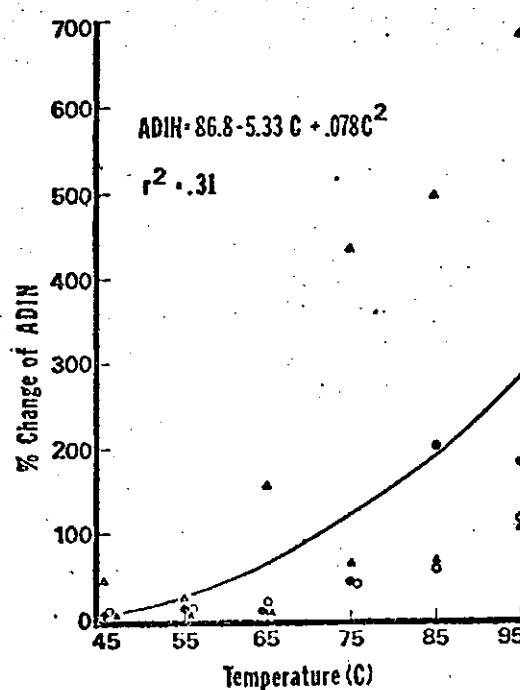


FIG. 15b Relationship between temperature and quantitative changes of acid-detergent insoluble nitrogen (ADIN) in heated wet samples (N=24, 6 samples/forage). (▲) Fresh grass. (●) Fresh alfalfa. (○) Fresh alfalfa stems. (▲) Alfalfa haylage.

Tannine ($C_{76} H_{52} O_{46}$), een macro molecuul, vormt onoplosbare complexen met eiwit. In kleine hoeveelheden komt het voor in de meeste veevoeder grondstoffen maar ook in eikebladen komt het in vrij grote hoeveelheden voor. Ook is de binding van de aan de structurele koolhydraten gehechte eiwitten, hoog in hydroxyproline, vaak zo sterk dat zij bij de ruwe celstofbepalingen in de onoplosbare fraktie achter blijven. Een redelijke correctie ervoor is een aftrek van 9x het N-gehalte van het eindproduct van de analyse.

N-VERDELING

Figuur 16 geeft een beeld van de verdeling van N over de frakties in een voeder. Van de niet beschikbare N zoals Maillard produkten wordt een groot deel in de celwandfrakties teruggevonden. Het probleem van die celwand analyses is dat niet alle -niet beschikbare N- in die fraktie terecht komt, maar een gedeelte. Verder is dit ook nog verschillend voor verschillende analyses. Nieuwe methoden worden vaak aangeprezen door verschillende analyse uitkomsten te sommeren en te vergelijken b.v. met NDF of ADF, maar de onzekerheid ten gevolge van die niet beschikbare N wordt vergeten.

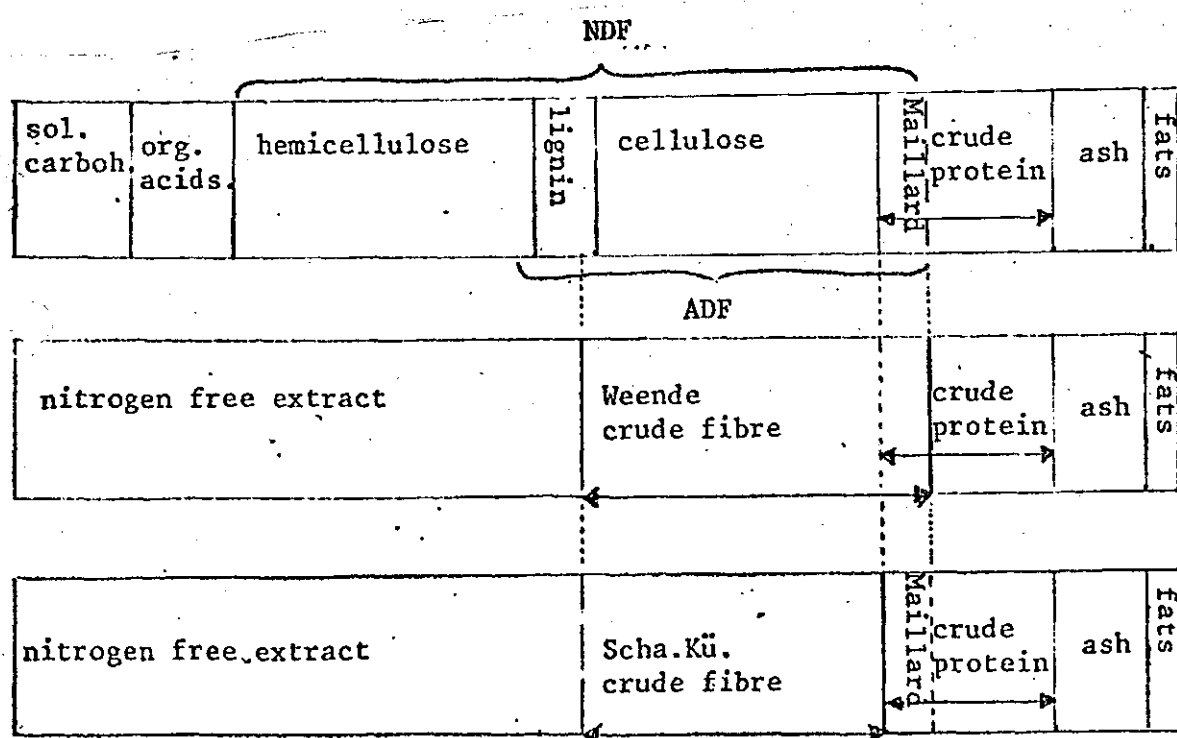


Fig. 16 Comparison of chemical composition, according to the proximate analyses and according to the procedure of v. Soest

NDF; VERGELIJKING MET RC

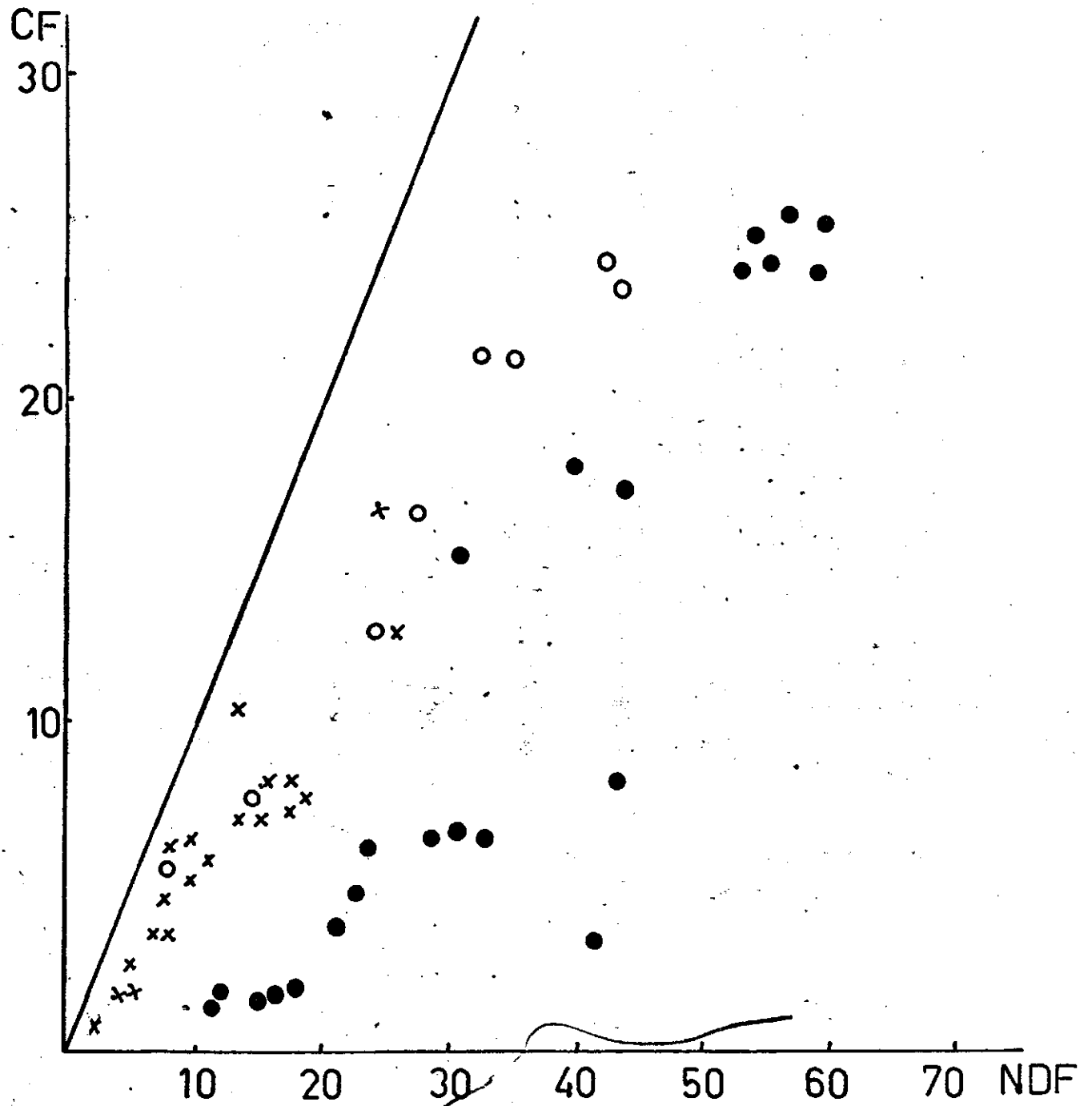
De NDF methode bepaalt duidelijk iets anders dan de ruwe celstofbepaling. Overeenkomst en verschil hangt in sterke mate af van het plantemateriaal. De NDF bepaalt in ieder geval de hemicellulose, cellulose, lignine en N-resten. De pectinen worden echter voor het grootste deel verwijderd. De ruwe celstof vezelfractie omvat echter steeds een deel van de NDF, in ieder geval is het grootste deel van de hemicellulose verwijderd. Dus materiaal met een hoog cellulose gehalte zal meer overeenkomst vertonen dan een materiaal hoog in hemicellulose,

In figuur 17 zien we als een voorbeeld van celluloserijk materiaal de dicotyle groenten (x) . De getrokken lijn geeft de overeenkomst aan tussen ruwe celstof en neutraal detergent vezel. De dicotyle groenten geven een lijn welke systematisch van de equivalentie lijn verschilt. De grassen daarentegen welke een hoog hemicellulosegehalte hebben (o) wijken sterk af van de equivalentie lijn. Voor de vlinderbloemigen (o) is de lignine vermoedelijk de oorzaak voor het toenemende verschil.

In tabel 5, van Mevr. Gaillard (71) komt sterk naar voren hoe slecht men over de celwand geïnformeerd is met alleen ruwe celstof, zelfs met alleen NDF.;

- nr. 16 en 17 grashooi en lucernehooi; voor grashooi is de NDF tweemaal de rc en in lucerne is de NDF gelijk aan de rc,
- nr. 7 en 8 rode klaver; rc is gelijk maar een 15% verschil in de NDF,
- dat zelfde treedt ook op voor grashooi nr. 14 en 15, waar, bij gelijk rc, de NDF 30 % verschilt.
- ook het omgekeerde komt voor; nr. 17 en 19 lucernehooi en hopklaver, hun NDF is praktisch gelijk maar hun ruwe celstof verschilt wel 50%.
- ook voor grashooi nr 16 en nr 26 is de NDF bijna gelijk maar ook hun ruwe celstof verschilt nog zo'n 15%.

Een waarschuwing voor over-simplificatie bij het trekken van konklusies uit de analyses is duidelijk op z'n plaats.



O Legumes - laag HC, hoge L.
 X Dicotyledonous non legume vegetables - hoog C, lage L.
 O Graminae - hoog HC, middelmatig L.

v. Soest in press.

Table 5 Organic matter digestibilities of roughages and contents of cell-wall substances, crude fibre and crude protein

No.	Type of roughage	Digestible org. matter	Lignin	Cellulose	Hemi- cellulose	Anhydro- uron. acid	N.D.R.	Crude fibre	Crude protein
1	grass hay *	64.2	7.34	25.21	27.54	5.80	66.83	31.94	14.66
2	grass *	82.8	2.96	15.26	19.30	5.19	44.99	20.79	20.19
3	art. dried grass *	79.5	2.94	14.84	16.72	4.36	52.84	20.85	25.89
4	early cut hay *	73.6	4.38	21.10	21.98	3.91	54.52	27.92	16.56
5	late cut hay *	60.3	7.10	28.07	27.61	4.20	70.53	38.34	8.51
6	red clover (<i>Trifolium pratense</i>)	70.7	4.72	16.11	11.99	3.38	39.17	25.34	17.38
7	red clover hay (<i>T. pratense</i>)	61.6	6.15	20.87	12.97	3.67	45.42	32.20	18.30
8	red clover hay (<i>T. pratense</i>)	53.3	8.08	20.45	17.16	4.92	53.99	33.09	18.65
9	ground lucerne (<i>Medicago sativa</i>)	57.4	7.50	18.85	13.42	3.95	47.18	33.75	15.60
10	ground lucerne (<i>M. sativa</i>)	53.2	9.07	22.41	14.63	4.20	51.35	36.87	14.87
11	grass *	74.2	3.60	17.35	18.78	3.73	48.65	23.68	15.93
12	grass *	76.5	3.97	20.26	20.45	3.23	48.26	24.56	12.48
13	grass *	66.2	6.31	17.24	17.42	4.26	48.80	24.69	19.11
14	grass hay *	71.3	4.33	19.60	23.47	4.18	45.63	26.63	12.08
15	grass hay *	66.4	4.63	20.80	23.82	4.66	60.06	28.51	14.76
16	grass hay *	56.6	6.51	25.29	26.12	4.17	63.10	32.68	11.37
17	lucerne hay (<i>M. sativa</i>)	55.0	5.73	14.18	10.86	2.44	37.25	38.39	17.05
18	lucerne hay (<i>M. sativa</i>)	59.6	7.33	21.33	15.30	3.97	51.03	34.47	18.43
19	hop trefoil (<i>Bl. lupulina</i>)	71.8	4.74	14.13	10.18	2.49	37.11	22.55	25.38
20	hop trefoil (<i>M. lupulina</i>)	76.1	3.05	11.30	8.56	2.75	26.74	16.87	24.97
21	Egyptian clover (<i>T. alexandrinum</i>)	66.6	5.24	14.89	10.68	3.75	39.80	22.05	21.59
22	Egyptian clover (<i>T. alexandrinum</i>)	79.0	3.59	9.25	7.72	3.16	31.82	11.34	22.74
23	red fescue (<i>Festuca rubra</i>)	48.0	7.91	30.58	31.28	3.46	77.68	44.47	4.03
24	cocksfoot hay (<i>Dactylis glomerata</i>)	64.8	6.19	21.13	23.78	4.75	60.62	30.05	15.76
25	green barley (<i>Hordeum vulgare</i>)	68.0	3.87	19.80	20.10	3.31	58.33	26.68	11.31
26	grass hay *	52.8	7.02	25.40	25.36	3.34	64.20	37.46	7.78
27	oat (<i>Avena sativa</i>)	52.9	6.34	22.56	19.98	2.13	55.46	34.01	6.68
28	ground pea straw (<i>Pisum sativum</i>)	61.6	5.88	14.35	14.31	3.98	43.72	24.56	16.61
29	pea vines (<i>P. sativum</i>)	64.9	5.24	13.99	13.36	2.88	44.75	22.96	16.86

* Mixed pasture grass < 3 % clover.

Mem. J. Agric. Sci., Vol. 14 (1966) No. 3 (August)

Mem. J. Agric. Sci., Vol. 14 (1966) No. 3 (August)

D. D. B. GILLARD

CALCULATION OF ROUGHAGE DIGESTIBILITY FROM CELL-WALL CONSTITUENTS

ADF; VERGELIJKING MET RC.

De ADF methode van v. Soest welke berust op het koken met een zure detergent geeft een duidelijk meer gedefinieerde cellulose fractie dan de ruwe celstof (61).

Het probleem is dat er nogal wat werk in gaat zitten om deze methode nu alsnog te gaan toepassen, terwijl eigenlijk alle aandacht op de typisch chemische methoden moet zijn gericht.

Vergelijken we in tabel 5 de resultaten in de kolom cellulose met de kolom crude fibre dan blijken de verschillen te liggen tussen de 4 en 24% absoluut bij een gehalte van 10 - 40%.

Vergelijken we de som van de kolommen lignine en cellulose met de ruwe celstof dan ligt het ruwe celstofgehalte nog 0 - 8,5% absoluut hoger. Voor gras en grashooi zijn de verschillen gering, maar b.v. voor lucerne en lucerne hooi zijn de verschillen nog groot. Blijkbaar wordt van lucerne een groot deel van de hemicellulose niet verwijderd bij de ruwe celstofbepaling.

Ook bij klaver lijkt de hemicellulose slecht oplosbaar. Meestal zien we in deze gevallen dat de NDR en de ruwe celstof beter op elkaar aansluiten. De vraag wordt dan belangrijk, in welke mate het dier deze soort hemicellulose kan benutten.

De konklusie uit deze beperkte hoeveelheid gegevens lijkt te zijn dat de ruwe celstof minder geschikt is en de analyse serie NDF, ADF (ADL (lignine)) uitgevoerd moeten worden. Arbeidstechnisch is dit onaantrekkelijk. Een voorlopige oplossing is, dat men ruwe celstof blijft hanteren, echter mits binnen enge groepen van plantaardig materiaal.

E. Verteerbaarheid.

DE GROEI VAN WEIDEGRAS I.V.M. SAMENSTELLING EN VERTEERBAARHEID.

Tabel 6.

Invloed van seizoensnede op samenstelling en verteerbaarheid. (72, 76).

	1		2		3		4		5	
	%ds	D	%ds	D	%ds	D	%ds	D	%ds	D
CC	53.4	72.2	46.4	71.3	47.7	66.3	46.5	65.0	47.7	65.3
HC	19.2	92.5	22.1	90.1	20.3	89.5	20.7	86.1	20.5	85.3
C	23.8	84.4	27.5	79.1	27.9	77.1	28.2	78.4	27.4	75.1
NDF	46.6	79.2	53.6	77.8	52.3	74.7	53.5	73.5	52.3	71.4
ADF	27.2	71.3	31.3	69.4	31.6	66.0	32.5	66.1	31.6	63.5
ADL	2.4	0	2.8	2.1	2.9	0.8	3.3	1.2	3.0	1.0
ADN	0,2	-	0.2	-	0.4	-	0.3	-	0.2	-

Deze tabel van de groep van Kirchgessner is nuttig om twee punten te bespreken, zelfs terwijl er niets bekend is over het produktie niveau en de groeidagen.

De ruwe chemische samenstelling verandert niet na de tweede snede.

Toch is het bekend dat de gehalten van de methoxy en acetylgroepen (78,80) blijft veranderen.

Algemeen geldt dat de celinhoud af- en de celwandbestanddelen toenemen in de eerste sneden.

In de latere sneden blijft de verteerbaarheid wel verder afnemen, dus er moet iets gebeuren met de structuur. Dit zijn de processen welke we niet meten met de celwand bepalingen. Door het maaien worden stengel en nerf bevoordeeld ten opzichte van blad (81), en daarmee kunnen andere chemische en kristallyne structuren toenemen. Ook het lignine gehalte dat wel blijft toenemen ondersteunt deze gedachte. Deinum & Jongbloed (1973) vonden een veel sterkere afname voor de verteerbaarheid van de stengel als voor het blad bij een latere maaidatum.

Bij verandering van vegetatieve grassen is het verloop van het ruwe celstof gehalte zeer temperatuur afhankelijk, zodat waar bij 25° C geen verandering in gehalte optreedt bij 15° C het ruwe celstofgehalte daalt. Ook de verteerbaarheid neemt toe met die daling in temperatuur. Dit is wat dan ook wordt waargenomen in het najaar, alleen is er wel meer stengel.

Minson et al. (1964) vonden dat bij verandering (april-juni) de verteerbaarheid van de organische stof drastisch achteruitgaat. De mate van achteruitgang is dan weer afhankelijk van soort en type. (82, 86). Het zal een ieder duidelijk zijn dat voor de schatting van de voederwaarde tenminste chemische samenstelling en verteerbaarheid nodig zijn.

De betrouwbaarheid hangt in sterke mate af van de nauwkeurigheid waarmee de componenten worden bepaald en dat laat nogal wat te wensen over.

De verteerbaarheid van de componenten is echter een onzekere maat, welke niet goed is te meten.

Berekening van de verteerbaarheid (87,91) uit de chemische analyses.

Er wordt hier niet gesproken over de ontwikkeling van regressieformules, daarover is reeds genoeg geschreven (60). Slechts fonten bronnen in de filosofie van de toepassing van de analyses staan ter discussie.

Tabel 7.

Regressie vergelijkingen van lignine tegen "in vivo" verteerbaarheid.

materiaal	n	y=b+ax	s	r
Klason lignine (v.Soest)				
gras	16	y= 65,84 - 1,08 x 3,52		- 0,734
vlinderbloemigen	9	y= 76,96 - 1,92 x 5,49		- 0,766
Trigol lignine (Edwards)				
gras	16	y= 76,25 - 1,47 x 2,00		- 0,922
vlinderbloemigen	10	y= 73,92 - 1,54 x 2,35		- 0,967
Permangaat lignine (v.Soest)				
gras	16	y= 74,39 - 1,40 x 2,25		- 0,900

c.s. Edwards J. Sci, Fd Agric 24 (1973) 381.

Het gebruik van een direkte korrelatie tussen het lignine gehalte en de in vivo verteerbaarheid is onjuist hoe mooi Edwards (43) ook de resultaten van zijn methode presenteert.

Wel valt er iets te zeggen over de verteerbaarheid van de celwand in relatie tot het lignine gehalte.

Van Soest (42) realiseert zich wel duidelijk dat hij alleen de maximale verteerbaarheid kan schatten met de op het lignine gehalte gebaseerde

formule : $D.CW = 1,473 - 0,689 \log K$ $RSD = \pm 0,047$

$K = ADL/ADF$

$D.CW =$ verteerbaarheid van de NDF.

Deze relatie vertoont een kromme welke hij verklaart uit de verschillende lignine pools. De Klason lignine is echter slechts één pool.

De redenen zullen eerder liggen aan een beperkte "verteerbaarheid" van lignine van 7 à 10 % (92,93) en dat de regel aan plantengroepen is voorbehouden, dus dat in het type en de plaats van de lignine tussen plantengroepen verschillen bestaan.

v. Soest beschrijft een relatie (94) tussen de schijnbare verteerbaarheid van de organische stof (D_{om}) en de werkelijke verteerbaarheid van de celinhoud (D_{cc}) en de celwand (D_{cwc}).

$$D_{om} = \% CC * D_{cc} + \% CWC * D_{cwc} - END.EKS.$$

De endogene ekskretie is tamelijk konstant.

Voor niet-herkauwers is de verteerbaarheid van de celwand praktisch nul, zodat uit nauwkeurige chemische analyses eventueel uitgebreid met eiwit verteerbaarheid, de verteerbare organische stof kan worden berekend.

Voor niet-herkauwers is dus ruw geschat $D_{om} = (100 - \% CWC)$.

Dat wil dus zeggen dat in principe de ruwe celstof, welke slechts een deel van de celwand is, niet geschikt is voor deze berekening en de NDF beter op z'n plaats zou zijn (95).

Henry (1976) laat zien dat voor de voorspelling van de schijnbare verteerbare energie (ADE), behoudens een groot verschil in nauwkeurigheid, zowel RC als ADF als NDF zijn te gebruiken.

$$ADE = 96,7 - 0,89 NDF$$

$$ADE = 94,5 - 2 ADF$$

$$ADE = 94,5 - 2,6 RC$$

Ook Boeye et al. (1973) vonden korrelaties tussen de ruwe celstof en de netto energie voor varkens (96) welke duiden op de bruikbaarheid van de ruwe celstof. Maar ook hier zou de variatie aanleiding kunnen zijn nog eens verder te kijken. Henry (1976) suggereert dat vanwege het algemeen gebruik van ruwe celstof maar met tabellen te werken waarin de relatie tussen ruwe celstof en de (schijnbare) verteerbare energie is gegeven voor de verschillende voederklassen. Op zich is zo'n benadering akseptabel omdat binnen voederklassen de verhouding cellulose/hemicellulose vrij konstant is, verder hebben de varkensvoerders een relatief laag celwandgehalte, zodat de invloed niet zo ingrijpend is.

Voor de herkauwers is de relatie van van Soest (94) te herschrijven tot:

$$D_{om} = 0.98 (100 - \% CWC) + D_{cwc} * \% CWC - 13.$$

De korrelatie tussen D_{om} en D_{cwc} is de belangrijkste, zodat de in vitro verteerbaarheid de beste laboratorium methode is. Alleen voor lage celwand gehalten met een lage verteerbaarheid, zoals lucerne, is de korrelatie tussen D_{om} en % CWC het grootst.

Zoals we reeds voor niet-herkauwers zagen is binnen de voederklassen dan ruwe celstof zowel als de detergent bepalingen te gebruiken. In dit geval zal ook het gehalte van ruwe celstof redelijk dicht die van NDF benaderen. (zie tabel 5).

III. Opmerkingen.

In dit verhaal is niet geprobeerd de problemen in de analyses ten behoeve van het veevoedingsonderzoek op te lossen. Het gaat erom dat de gebruiker zich enigszins realiseert welke beperkingen aan de uitkomsten van de analyses kleven.

Daarnaast moet hij zich afvragen of de korrelaties welke ontwikkeld zijn berusten op een logisch verband.

De grote doorbraak in de analyse mogelijkheden zal nog wel even op zich laten wachten, maar met wat geluk kan met behulp van gaschromatografie een tijdelijke oplossing worden ontwikkeld. Daarom ook is het belangrijk het verzuim van 100 jaar goed te maken en voorafgaande aan de ontwikkeling van nieuwe methoden een analyse filosofie te ontwikkelen.

Verbreiding van begrip en kennis naar andere vak disciplines en samenwerking tussen instituten zal onontbeerlijk zijn wanneer de moeilijke en dure fysischchemische technieken ontwikkeld moeten worden.

(UV, IR, RAMAN, NMR, ESR.).

IV Samenvatting.

Problemen rond het gebruik van analyse resultaten zijn voor een deel te wijten aan het niet eenduidig zijn van de methoden en voor een deel aan een onjuist gebruik van de resultaten. Voor de ontwikkeling van bepalingen welke beter aansluiten bij de verteringsprocessen in het dier zijn nieuwe wegen nodig voor een kans op succes. De grootste kanshebbers zijn hier de fysisch-chemische methoden, zoals Infraroodreflektie, vanwege hun snelheid en eenvoud van werkuitvoering.

Een tijdelijke oplossing voor betere celwand analyses kan met behulp van de gaschromatografie ontwikkeld worden.

De vele analytische technieken welke heden nog in gebruik zijn, kunnen niet zo maar worden afgewezen. Het meeste voedingsonderzoek is gebaseerd op resultaten welke over vele jaren zijn verzameld. Daarom is een discussie nodig over de voor- en nadelen van de verschillende methoden en over het gebruik van de resultaten. De analyse technieken bepalen het gehalte aan chemische bestanddelen van de celwand maar zij zeggen niets over de wijze waarop zij in die celwand zijn georganiseerd. De scheidingen worden uitgevoerd op grond van verschillende oplosbaarheid of oxidatie gevoeligheid van de verschillende koolhydraten. Een tweede mogelijkheid is de enzymatische afbraak. De plaats in de celwand evenals het celtype en leeftijd beïnvloeden de oplosbaarheid van de bestanddelen. Voor elk van de koolhydraten bestaan verscheidene methoden ieder met zijn eigen problemen. Om een nauwkeuriger beeld van de koolhydraatsamenstelling van de celwand te verkrijgen zijn andere schema's ontwikkeld welke een stapsgewijze scheiding van de componenten beschrijven. Deze fraktionering is zeer arbeidsintensief en daarom alleen van nut voor research doeleinden. Ruwe celstof is nog steeds de meest gebruikte celwandfractie. De belangrijkste voorschriften zijn de NEN 3327, NEN 3326 en Scharrer-Küschner. Omdat deze methoden niet eenduidig zijn, een mengsel van koolhydraten bepalen, hangt het resultaat af van het planttype en groeistadium en van eiwitbeschadiging ten gevolge van onzorgvuldige behandeling van voer of monsters.

Alternatieven voor de ruwe celstof zijn de scheidingen met detergentia. Tenslotte wordt het gebruik van de resultaten in het verteerbaarheids onderzoek besproken. Er wordt gesteld, dat de bruikbaarheid van de analysetechnieken verschillend zullen zijn voor herkauwers en niet-herkauwers.

V. Summary.

Problems in the use of analytical results are partly due to the absence in uniformity of the components determined by the methods and partly to an incorrect use of the results. For the development of determinations which links up more with the digestion processes in the animal new ways have to be gone for any success. Here the best chances are for the physico - chemical methods like Infraredreflection because of its rapidity and simplicity of labour. A temporary solution for better cellwall analyses may be developed by means of gaschromatography. Many analytical technics in use cannot easily be denied. Most of the animal feeding and nutrition research is based on data gathered in a period of years.

For this reason there is need for a discussion on the advantages and disadvantages of the various technics and the use of the results. The analytical techniques measure the content of chemical components of the cellwall but they give no information about the framing in the cellwall. The separations are based on the difference in the solubility or oxidation sensitiveness of the different carbohydrates. A second possibility is the enzymatic degradation. The place in the frame on the cellwall as well as cell type and age influence the solubility of the components. For the determination of the components there are several methods and each has its own problems. For a more accurate picture of the carbohydrate composition of the cellwall analyse schemes are developed which describe step wise separation of the components. This fractionation is very labourious and therefore for use in research work only.

Crude fibre is still the most used cellwall fraction. The most important methods are NEN 3327, NEN 3326 and Scharrer - Küsschner. As these methods don't determine one component alone but a mixture of components results depend on the type of plant and growth phase as well as on protein damage caused by uncaredful treatments of feeds or samples.

Alternatives for crude fibre are the separations with the aid of detergents. The use of the results for the digestion trials are discussed.

It is stated that the usefulness of the analytical techniques are different for trials with ruminants and non-ruminants.

VI Literatuur

1. Premier cours d'Hohenheim sur l'alimentation d'animaux dans les regions tropicales et subtropicales 1978 (CANT 1) K.H. Menke et.al.
2. Methods in carbohydrate chemistry (Series),.
Ed. R.L. Whistler Academic Press. N.Y. 1965.
3. Predicting forage quality by Infrared reflectance spectroscopy
K.H. Norris, J.S. Shenk et.al. J. Anim Sci 43 (1976) 889.
4. The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch.
R.M. McCready, W.Z. Hassid Journal unknown 65 (1943) 1154
5. α - and β -glycosidases in Maize roots
E. Tanimoto, P. Pilet Planta 138 (1978) 119
6. The walls of growing Plant cells
P. Albersheim Sci. American 232 (1975) 80-95
7. De celwand van de plant.
M.M.A. Sassen Natuur en Techniek 39⁷ (1971) 1
8. The degradation of lignin and quantitative aspects of ruminant digestion. P. Porter, A.G. Singleton Br. J. Nutr 25 (1971) 3
9. Ingestion control in growing ruminant animals by the components of cell wall constituents.
M.W. Colburn, J.L. Evans, C.H. Ramage, J. Dairy Sci 51 (1968) 1458.
10. Dietary fiber components: relationship to the rate and extent of ruminal digestion D.R. Mertens Fed. Proceedings 36 (1977) 187
11. Lignins.
K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig Wiley Interscience 1971
12. Effect of lignin on rate of in vitro cell wall and cellulose disappearance in corn.
V.L. Lechtenberg, V.F. Colenbrander, et.al. J. Anim Sci 39 (1974) 1165
13. Food and dietary fibre Nutr. Rev. 35 (1977) 6-11
H. Trowell
14. What is fibre and fibre in food
P.J. v. Soest, J.B. Robertson Nutr. Rev. 35 (1977) 12-22
15. The chemistry of dietary fibres Nutr. Rev. 35 (1977) 23-30
Olof Theander
16. Le dosage du lactose et de ses produits d'hydrolyse dans le lait et dans quelques produits laitiers; methodes et appareillages tirés de la litterature parue entre 1964 et 1974.
J.D. Bosset et.al. Trav. Chim. Alim. et Hyg. 67 (1976) 488.
17. ISO/TC34/SC10 (France-8) 111. Comparison document Determination of sugar/ Study on the differences between the EEC and the AOAC-methode.
18. Bepaling van het gehalte aan reducerende suiker, ruwe totaal suiker, saccharose en ruwe lactose. NEN 3571 dec. 1974.
19. De bepaling van oplosbare suikers
MSM Bosman C.I.L.O. Mededelingen nr. 3 (1953)
20. Suikerbepaling volgens Schoorl. Chem. weekblad 34 (1912) 678.
21. Bepaling van glucose en fructose.
J.E. van der Planck Biochem. J. 30 (1936) 457.

22. A study of clarification methods in the determination of sugars in white potatoes.
K.T. Williams et. al. J. AOAC 32 (1949) 698
23. Removing and analyzing total Non-structural carbohydrates from plant tissue.
D. Smith. Research Report 41 (1969) Univ. of Wisconsin.
24. Increasing the sensitivity of the Anthrone method for carbohydrate .
M.A. Jermijn Anal Bioch. 68 (1975) 332.
25. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage.
T.A. Thomas J. Sci. Fd. Agric 28 (1976) 639.
26. Two improved methods for the determination of soluble carbohydrates.
A.E. Flood, C.A. Priestley J. Sci. Fd. Agric.
27. Determination of sugar in plant materials: Measurement of unreduced copper by AAS.
A.L. Potter et. al. J. AOAC 51 (1968) 748.
28. Vergleichende Zucker-Bestimmungen mit gaschromatographischer enzymatischer- und reduktometrischen Methoden.
K. Zürcher, H. Hadorn. Deutsche Lebensmitt. Rundschau 6 (1976) 197.
29. Vergleichende Zuckerbestimmungen an Kraftnährmitteln und Frühstücksgetränken.
K. Zürcher, H. Hadorn. Mitt. a.d. Gebiete d. Lebensm. Unters-Hyg. 67 (1976) 379.
30. Bepaling van het gehalte zetmeel NEN 3572 december 1974.
31. Bepaling van het gehalte zetmeel met behulp van enzymatisch hydrolyse.
NEN 3574 december 1974.
32. Bepaling van zetmeel-Polarimetrische methode. EEC Nr. L/23/7 29.5.72
33. Enzymatic determination of starch in feeds, feed ingredients and faeces
W.W. Turner J. ADAC 52 (1969) 956.
34. Analyses of starch in wheat milling fractions.
R.M. Saunders et. al 54th Animal meeting Chicago Hl. 1969.
35. Rapid determination of crude fiber in cereals
J.H. v.d. Kamer, L. van Ginkel, Cereal Chemistry 29 (1952) 239.
36. Determination of crude fibre EEC
37. Determination of crude fibre, Modified Scharrer method ISO/TC34/WG3/N59.
38. Rapid method for the determination of crude fibre ISO/TC34/WG3/N12 rev.
39. De bepaling van ruwe celstof in veevoeders en mest
A. Kemmink Intern rapport nr. 23 IVVO 1967.
40. Vergelijking van ruwe celstof bepalingsmethoden.
A. Nijenhuis, A. Steg. Doc. rap. 28 IVVO 1977.
41. Determining fiber in cereals
D. Baker Cereal chem. 54 (1977) 360
42. Vezels.
P.J. van Soest Collogia op 10 en 11 febr. 1975 op Landb. plantenteelt Wageningen.
43. Determination of lignin and cellulose in forages by extraction with triethylene glycol.
C.S. Edwards J. Sci. Fd. Agric. 24 (1973) 381.
44. The determination of lignin
J.W. Czerkawski Br. J. Nutr. 21 (1967) 325.
45. Forage fiber analyses
Agriculture Handbook no. 379

46. A semi micro method for the determination of lignin and in use in predicting the digestibility of forage crops.
I.M. Morrison J. Sci. Tt Agric. 23 (1972) 455.
47. Studi sulla lignina II
F. Mailillotti Ann. Ist. Spec. Zootech 7 (1974) 23
48. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate.
P.J. v. Soest, R.H. Wine J. AOAC 51 (1968) 780
49. Symposium on nutrition and forages and pastures:
New chemical procedures for evaluating forages.
P.J. van Soest J. of Anim Sci (1963) 838.
50. Modified procedure for determining plant cell wall by the neutral detergent procedure.
P.J. van Soest Annual ASAS Meeting Madison July 1977.
51. A detailed summative analyses of the crude fibre and nitrogen free extractives fractions of roughages.
B. Gaillard J. Sci. Fd Agric 3 (1958) 170.
52. The structural carbohydrates of grasses.
R. Waite, A. Gorrod. J. Sci. Food Agric. 10 (1959) 308.
53. Routine analyses of carbohydrates and lignin in herbage.
R.E. Deriaz. J. Sci. Fd. Agric 12 (1961) 152
54. Dietary fiber estimation in concentrate feedstuffs no. 636.
J.B. Robertson, P.J. van Soest.
69th Meeting of the American Society of Animal Science.
University of Wisconsin, Madison July 23-27, 1977.
55. Enzymatic determination of the indigestible residue content of human food.
E.W. Hellendoorn, et.al. J. Sci. Td Agric. 26 (1975) 1461.
56. Fibre in Nutrition
D.A.T. Southgate Bibliotheca Nutr. Dieta 22 (1975) 109.
57. The definition and analyses of dietary fibre. Nutr. Re. 35 (1977) 31-37
D.A.T. Southgate.
58. Analytical methods for dietary fibre
D.A.T. Southgate EEC-IARC working party, Lyon 1977.
59. Procedure for the analyses of the sugars, starch and dietary fiber components in foods.
H. Englyst EEC-IARC working party, Lyon, december 1977.
60. A comparison of some laboratory techniques for the estimation of the digestibility of the organic matter in forage samples
C.J. van der Koelen, A.J.H. van Es. Neth. Agric.Sci. 21 (1973).199.
61. Chemical methods for assessing the nutritive value of forages. A review
D.F. Osbourn. In press. Livest. prod. Sci 5 (1978).
62. Structural inhibitors of quality in forage.
B. Deinum Växtodling 28 (1973) 42
63. Relationship between measurements of heating and acid-detergent insoluble nitrogen in heat damaged fresh alfalfa, haylage and hay.
Yu Yu J. Dairy Sci 59 (1976) 1845
64. Effect of heating on quantitative changes of acid-detergent in soluble nitrogen.
Yu Yu J. Dairy Sci. 60 (1977) 1813.

- 65, 66, Untersuchungen zu Maillard - Reaktion
VIII, Th. Wieland, T. Severin Z. Lebensm. Unters-Forsch. 153 (1973) 201.
IX, Brautigam, T. Severin " " " 154 (1974) 80.
67. The isolation of plant cell wall preparations with low nitrogen contents
I.M. Morrison J. Agric. Sci. Camb. 80 (1973) 407.
68. Carbohydrates associated with leaf protein
G.N. Testenstein J. Sci. Fd. Agric. 27 (1976) 849.
69. ISO/TC34/SC10 (Czechoslovakia-3)100
Study on the determination and chemical composition of crude fibre.
70. ISO/TC34/SC10 (J.M. van der Meer)148
Comments on the study on the determination and chemical composition of crude fibre.
71. Calculation of roughage digestibility from cell wall constituents
BDE Gaillard Neth. J. Agric. Sci. 14 (1966) 813.
72. Chemische Analyse und verdaulichkeit der Kohlenhydrate des Weidelgrases
H.H. Dietrich et. al. Das WirtschaftsE.Futter (1976) 173.
73. Potential of new summer grasses in Northland.
A.D. Taylor N.Z.J. of Agric. Res. 19 (1976) 483.
74. The field assessment of digestibility of grass for conservation
R.J.K. Walters ADAS Q Rev. 23 (1976) 323.
75. Evaluating forage quality of pastures.
I.S. Campbell et.al. J. Range Management 28 (1975) 149.
76. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers
A.B. Wylam J. Sci. Fd. Agric. 4 (1953) 527.
77. Detergentie analysen zur bestimmung von Gehalt und Verdaulichkeit der Zellwand fraktionen in Weidegras.
K. Raufft et. al Landwirtsch. Fisch 29 (1976) 124.
78. Acetylgroups in cell wall preparations for higher plants
J.S.D. Bacon et.al. Biochem. J. 149 (1975) 485
79. Acetylgroups in nature glucomannan from Easter Lily bulls
T. Matsuo, T. Mizumo Agric Biol. Chem. 38 (1974) 465.
80. Phenylisocyanide derivatives of carbohydrates
- Location of the O-Acetyl groups in Birch Xylan.
H.D. Bouveng Acta Chemica Scand. 15 (1961) 96.
81. The effect of temperature on the digestibility of grasses
J.G.F. Dirven, B. Deinum 1977 India.
82. Welke factoren beïnvloeden de kwaliteit van gras.
B. Deinum Landbouwplantenteelt (1968) 191.
83. Agriculture Group symposium - The nutritive value of plant fibre
J. Sci. Fd. Agric. 26 (1975) 1433-1438.
84. Carbohydrate research in plants and animals.
Miscellaneous papers 12 (1976) L.H. Wageningen.
- 85, 86. The evaluation of artificially dried grass as a source of energy for sheep.
R. Waite et. al. J. Agric. Sci. 62 (1964) 391, 62 (1964) 399.
87. Apparent and true digestibility of the Weende components, cell content and cell wall of Rye grass.
L.A. Carlier et.al. Anim Fd. Sci. Techn. 1 (1976) 607.

88. Formulation of hay-grain diets for ruminants.
E.J. Golding et. al. J. Anim Sci 42 (1976) 710.
89. Laboratory methods for evaluation of the energy value of feedstuffs and feed compounds for ruminants.
R. Vestergaard Thomson, J. Henriksen.
Report 436 (1976) Royal Vet. and Agric Univ. Copenhagen.
90. A comparison of methods of measuring fibre in vegetable material
AA Mc Connell, M.A. Eastwood. J. Sci. Fd, Agric. 25 (1974) 1451.
91. Structural fibre in ruminant Rations.
D.J. Thomson et. al. Växfodling 28 (1973)
92. E. Farries, A. Requijs Wirtschafteig. Futter 16 (1970) 154.
93. K. Nehring, W. Laubé Arch. Tierernähr. 5 (1955) 177.
94. New chemical methods for analyses of forages for the purpose of predicting nutritive value.
P.J. v. Soest, L.A. Moore. Proc. 9th. Int. grassl. Congr. Sao Paulo, Brasil, 783-789.
95. Prediction of energy values of feeds for swine from fiber content
J.M. Henry pag. 270.
Feed composition, Animal Nutrient requirements and comonterization of diets Ed. P.V. Tonnebeek e.a. Int. Symp. Utah State Univ., Logan, Utah Juli 11-16 (1976).
96. Verteringsproeven met varkens:
J. Boeve, B. Smits, J. Dammers. Verslagen v. Landbouwk. onderz. 809 (1973).