

Slutrapport till SLF

Projekttitel: Meta-analys av faktorer som påverkar ensileringen av grovfoder

Projektnummer: H0941372

Rapportens författare: Bengt-Ove Rustas, Kamyar Mogodiniyai Kasmaei, Peter Udén

BAKGRUND

I länder som Sverige, med relativt kort odlingsäsong, är konservering en förutsättning för att kunna försörja produktionsdjuren med grovfoder under hela året. Ensilering är idag den viktigaste konserveringsmetoden i Sverige och i många andra länder på grund av att den är relativt oberoende av väderleksförhållanden vid skörd.

Slutprodukter vid den fermentation som sker vid ensilering bestämmer till stor del hygienisk kvaliteten och näringsvärde i det färdiga ensilaget och har inverkan på nötkreaturens foderkonsumtion samt även mjölksammansättning. Höga halter av ammoniak och organiska syror har visats minska ensilageintaget (Huhtanen et al., 2007) . Förhöjda nivåer av mjölksyra eller totala syror minskar mjölkfett- och proteinhalten i mjölk (Huhtanen et al., 2003) . Höga halter av etanol i ensilage kan minska mjölkavkastningen men öka mjölkfett och proteinhalt och även ge smakfel i mjölk (Randby et al., 1999).

Fermentationsprodukternas sammansättning uppvisar stor variation och är ofta oförutsägbar. Det har gjorts vissa försök att förutsäga ensileringsresultat i grovfodergrödor utifrån grönmassans sammansättning (Weissbach et al., 1974, Pitt et al, 1985; Leibensperger och Pitt, 1987). Bristen i dessa studier har varit antingen att ensilagekvaliteten inte beskrivit tydligt eller att hänsyn inte tagits till bildning av slutprodukter såsom alkoholer. Det är fortfarande okänt i vilken utsträckning grönmassans sammansättning påverkar enskilda fermentationsprodukter i det färdiga ensilaget. Syftet med denna studie var att ta fram prognosmodeller för fermentationsprodukter i ensilage utifrån grönmassans sammansättning vid skörd.

MATERIAL OCH METODER

Ensilagedatabas

En databas byggdes upp ensileringsförsök utförda vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU, mellan 1994 och 2011 . Databasen innehöll 118 olika grödor varav 30 var rena gräsvallar, 7 baljväxtvallar, 15 blandvallar med gräs och baljväxter 66 majs. Alla grödor odlades i mellersta Sverige och varierade i mognadsgrad och skördenummer. Ensileringsperiod och silotyp varierade från 90 till 151 dagar och från 1,5-liters glassilos till 25-liters silos av rostfritt stål . Alla silos var lufttäta och hölls vid $20 \pm 2^\circ \text{C}$ under ensileringsperioden. Inga behandlingar med tillsatsmedel ingick i databasen . Variabler i grönmassan inkluderade

torrsubstans (TS), vattenlösliga kolhydrater (WSC), buffertkapacitet (BK), råprotein (CP), fiber (neutral detergent fibre, NDF), aska, stärkelse och mjölksyrabakterier (LAB). Fermentationsprodukter inkluderade organiska syror (mjölksyra, ättiksyra, propionsyra och smörsyra), alkoholer (etanol och 2,3-butandiol) och ammoniumkväve (NH₃-N). Medelvärde, spridning och standardavvikelse av komponenter i grödor och förjäsningssprodukter ges i tabell 1.

Tabell 1. Grönmassans sammansättning och fermentationsprodukter efter ensilering i vall- och majsgrödor (g/kg ts om inte annat anges)

<u>Grönmassa</u> ³	Vall				Majs			
	Medel	Spridning	SD ¹	n ²	Medel	Spridning	SD	n
TS (g/kg)	346	131 – 623	139.9	52	291	200 - 406	56.4	65
RP	152	61 – 220	33.4	52	83	58 - 103	9.5	66
WSC	119	27 – 333	58.7	52	108	10 - 235	59.4	66
Stärkelse	-	-	-	-	208	13 - 400	113	65
NDF	-	-	-	-	447	351 - 553	56.2	65
Aska	-	-	-	-	45	36 - 58	5.7	65
BK (g LA/100g DM)	5.6	3.8 - 10.7	1.4	34	-	-	-	-
LAB (log CFU/g FM)	3.4	1.2 - 5.5	1.2	39	4.9	2.5 - 7.6	1.5	50
<u>Fermentationsprodukter</u>								
NH ₃ -N, (g/kg total N)	96.6	0.2 - 414.5	87.1	50	84.5	56.8 - 139.7	18.4	66
Mjölksyra	34.5	0.1 – 133	34.7	52	50	11.8 - 95.2	20.8	66
Ättiksyra	13.7	0.3 - 82.8	16.6	52	18.5	4.3 - 55.8	11.6	66
Smörsyra	16.4	0.1 - 105.9	26.5	42	0.7	0.1 - 11.7	1.9	63
Propionsyra	5.6	0.1 - 57.5	9.9	36	1.6	0.1 - 14.3	2.8	63
2,3-Butandiol	8.7	0.1 - 90	15.9	46	4.2	0.1 - 18.5	3.6	63
Etanol	16.6	2.5 - 131.6	18.7	48	11.5	0.9 - 34.7	7.6	66

¹SD = standardavvikelse

²n = antal observationer

³TS = torrsubstans; RP = råprotein; WSC = vattenlösliga kolhydrater; NDF = neutral detergent fiber (fiber); BK = buffertkapacitet; LA = mjölksyra; LAB = mjölksyrabakterier; CFU = kolonibildande enheter; FM = färskmassa.

Laboratorieanalyser

Proverna torkades vid 60° C över natten och maldes på kvarn med ett 1-mm såll före vidare analys. Torrsubstans bestämdes efter torkning i 103° C och askhalten efter 550° C i 3 timmar. Råproteinhalten bestämdes som Kjeldahlkväve multiplicerat med 6,25 . Stärkelse och WSC bestämdes med en enzymatisk metod enligt Udén (2006, 2010) . Halten NDF bestämdes enligt Chai och Udén (1998) med tillsats av amylas. Buffertkapaciteten mättes enligt Weissbach et al. (1974). Grödprover inockulerades på odlingssubstrat för kvantifiering av LAB (Seale et al., 1986) .

Organiska syror och alkoholer analyserades i prover från ensilagesaft med HPLC-teknik (Andersson och Hedlund, 1983) . Den metod som beskrivs av Broderick och Kang (1980) användes för att mäta NH₃-N.

Statistisk analys

Alla statistiska analyser genomfördes med hjälp av SAS (v. 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Vall- och majsensilage hanterades separat i den statistiska analysen beroende på grödornas skilda karaktär. Relationer mellan variabler för sammansättning av grönmassa och fermentationsprodukter studerades med korrelationsanalys och betraktades som signifikanta vid $P < 0,05$. Prognosmodeller för fermentationsprodukter arbetades fram med proceduren REG varvid multipla regressionsmodeller byggdes genom den så kallade stepwise-metoden. Variabler testades och behålls i modellen vid $P < 0,15$. Proceduren Univariat användes för att testa normalfördelning hos fermentationsprodukter och logaritmisk transformation av responsvariabler användes om de inte var normalfördelade. Alla resultat redovisas som icke transformerade värden.

RESULTAT

Korrelationsanalys av fermentationsprodukter

Pearsons korrelationskoefficienter mellan fermentationsprodukterna i de olika ensilagen presenteras i tabell 2 och 3. I båda databaserna var ammoniakkväve positivt korrelerad med smörsyra och 2,3- butandiol . Resultaten från korrelationsanalysen skilde sig på flera sätt mellan vall- och majsensilagen. Till exempel var ammoniumkväve och ättiksyra positivt korrelerade ($r = 0,773$) i vallensilage men var okorrelerade i majsensilage. Ingen koppling fanns mellan etanol och övriga fermentationsprodukter i vallgrödorna men i majsensilagen var etanol positivt korrelerad med mjölksyra och ättiksyra.

Regressionsanalys

Resultat från regressionsanalyser av fermentationsprodukter i vallensilage på variabler i grönmassan presenteras i Tabell 4. Högre TS-halt i grönmassan (131 till 623 g/kg) innebar lägre koncentrationer av samtliga analyserade fermentationsprodukter. I

regressionsmodellerna för ammoniumkväve och smörsyra ingick TS och WSC med liknande vikter. Den bästa modellen erhöles för ättiksyra med ett R^2 - värde på 0,63 när TS, LAB och RP inkluderades. Residualerna i modellerna för mjölksyra, propionsyra, 2,3- butandiol och etanol var inte normalfördelade och därför log-transformerades värdena. Åtgärden innebar ingen förbättring i modellen för mjölksyra och den redovisas därför inte.

Resultat från regressionsanalyser av fermentationsprodukter i majsensilage på variabler i grönmassa presenteras i Tabell 5. Råprotein visade ett starkt samband med mjölksyra, etanol och ättiksyra. Stärkelse hade ett nästan lika starkt inflytande i modellerna med ammoniumkväve, smörsyra och propionsyra. I motsats till vallensilage hade TS-halten försumbar inverkan på fermentationsprodukterna i majs förutom de två alkoholerna, etanol och butandiol. De bästa regressionsmodellerna erhöles för mjölksyra och etanol där variabler i grödans sammansättning förklarade 0,84 respektive 0,61 av den totala variationen.

Tabell 2. Korrelationskoefficienter mellan fermentationsprodukter i vallensilage

	NH ₃ -N	Mjölksyra	Ättiksyra	Smörsyra	Propionsyra	2,3-Butandiol	Etanol
NH ₃ -N	-						
Mjölksyra	NS ¹	-					
Ättiksyra	0.771***	NS	-				
Smörsyra	0.774***	-0.365*	0.714***	-			
Propionsyra	NS	NS	0.421*	NS	-		
2,3-Butandiol	0.453**	NS	NS	NS	NS	-	
Etanol	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-

¹NS = ej signifikant ($P \geq 0.05$).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Tabell 3. Korrelationskoefficienter mellan fermentationsprodukter i majsensilage

	NH ₃ -N	Mjölksyra	Ättiksyra	Smörsyra	Propionsyra	2,3-Butandiol	Etanol
NH ₃ -N	-						
Mjölksyra	NS ¹	-					
Ättiksyra	NS	0.443***	-				
Smörsyra	0.645***	NS	NS	-			
Propionsyra	0.646***	NS	NS	0.794***	-		
2,3-Butandiol	0.718***	-0.370**	NS	0.687***	0.705***	-	
Etanol	NS	0.627***	0.477***	NS	NS	NS	-

¹NS = ej signifikant ($P \geq 0.05$).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Tabell 4. Regressionsmodeller för frementationsprodukter i vallensilage och komponenter i grönmassan (rena gräs- och baljväxtvallar samt blandvall, g/kg TS om inget annat anges)

	Intercept/lutning	SE	P-värde	R ² kummulativ
NH₃-N¹ (g/kg total N)				
Intercept	295.68	42.02	< 0.001	
TS (g/kg)	- 0.45	0.12	< 0.01	0.34
WSC	- 0.42	0.21	0.06	0.43
Ättiksyra				
Intercept	8.52	15.50	0.59	
TS (g/kg)	-0.10	0.02	< 0.0001	0.47
LAB (log CFU/g GM)	4.89	2.00	0.02	0.58
RP	0.13	0.07	0.08	0.63
Smörsyra				
Intercept	77.92	12.22	< 0.0001	
TS (g/kg)	-0.15	0.04	< 0.001	0.41
WSC	-0.12	0.06	0.06	0.48
Propionsyra				
intercept	1.28	0.27	< 0.0001	
TS	-0.003	0.001	< 0.01	0.30
2,3-Butandiol				
Intercept	2.24	0.56	< 0.001	
TS	-0.003	0.001	0.01	0.14
LAB (log CFU/g GM)	-0.27	0.11	0.02	0.29
Etanol				
Intercept	1.09	0.14	< 0.0001	
WSC	0.003	0.001	< 0.001	0.29
TS	-0.001	0.0004	0.01	0.46

¹NH₃-N = ammoniumkväve; TS = torrsubstans; RP = råprotein; WSC = vattenlösliga kolhydrater; LAB = mjölksyrabakterier; CFU = kolonibildande enheter; GM = grönmassa.

DISKUSSION

Korrelationsanalys

Korrelationer mellan fermentationsprodukter var inkonsekventa i vall- jämfört med majsensilage. Det kan delvis bero på det begränsade antalet observationer i studie . Man bör även ta hänsyn till att andelen slutprodukter påverkas av flera faktorer t.ex. den mikrobiella fältfloras sammansättning, vilka substrat som förjäses och vilken väg förjäsningen tar. Den sistnämnda aspekten påverkas av miljöfaktorer såsom pH, substratkoncentration och red-ox status (McDonald et al., 1991). Resultaten antyder att ett konstant förhållande mellan slutprodukter inte existerar. Som ett exempel kan mjölksyra och ättiksyra bildas i ett förhållande 1:1 när heterofermentativa mjölksyrabakterier förjäser glukos. De kan också

bildas från oberoende jäsningsvägar med flera substrat och mikroorganismer inblandade (McDonald et al., 1991). I det första scenariot skulle mjölksyra och ättiksyra vara positivt korrelerade, medan det i det senare fallet inte är självklart att det finns en positiv korrelation.

Tabell 5. Regressionsmodeller för fermentationsprodukter i majsensilage och komponenter i grönmassan (g/kg TS om inget annat anges)

	Intercept/lutning	SE	P-värde	R ² kumulativ
NH₃-N¹ (g/kg total N)				
Intercept	60.43	4.12	< 0.0001	
Stärkelse	0.12	0.02	< 0.0001	0.43
Mjölksyra				
Intercept	-87.41	18.98	< 0.0001	
RP	1.15	0.23	< 0.0001	0.67
Aska	2.18	0.47	< 0.0001	0.78
NDF	-0.20	0.05	< 0.001	0.81
LAB (log CFU/g GM)	4.99	1.81	0.01	0.83
WSC	0.06	0.03	0.07	0.84
Ättiksyra				
Intercept	-0.42	0.27	0.12	
RP	0.02	0.003	< 0.0001	0.45
Smörsyra				
Intercept	-3.31	0.75	< 0.0001	
Stärkelse	0.004	0.001	< 0.0001	0.25
Aska	0.04	0.01	0.01	0.37
Propionsyra				
Intercept	-3.29	0.69	< 0.0001	
Stärkelse	0.004	0.001	< 0.0001	0.31
RP	0.02	0.01	< 0.01	0.44
2,3-Butandiol				
Intercept	4.35	1.07	< 0.001	
WSC	-0.01	0.002	< 0.0001	0.34
RP	-0.02	0.01	< 0.01	0.42
TS (g/kg)	-0.004	0.002	0.05	0.47
Etanol				
Intercept	-2.49	0.46	< 0.0001	
RP	0.03	0.004	< 0.0001	0.52
TS (g/kg)	0.003	0.001	< 0.01	0.61

¹ NH₃-N = ammoniumkväve; TS = torrsubstans; RP = råprotein; WSC = vattenlösliga kolhydrater; LAB = mjölksyrabakterier; CFU = kolonibildande enheter; GM = grönmassa; NDF = neutral detergent fiber (fiber).

Regressionsanalys

Data som samlats in i denna studie kom från välkontrollerade laboratoriestudier för att säkerställa enhetliga ensileringsförutsättningar (t.ex. temperatur, luftgenomsläpp, etc.) . De relativt svaga regressionsmodeller som erhållits tyder på att grödans kemiska sammansättning, buffertkapacitet och innehåll av mjölksyrabakterier är otillräckliga för att förklara variationen i det färdiga ensilaget innehåll av fermentationsprodukter. Wilkinson et al. (1981) erhöll liknande resultat när TS, WSC och buffertkapacitet användes som förklaringsvariabler. En av bristerna vid ensileringsstudier är att det inte finns någon metod för att mäta substrat som blir tillgängliga under fermenteringen. Dessa substrat kan härröra från strukturella kolhydrater (t.ex. hemicellulosa och pektin) och kan frigöras genom sur hydrolys eller enzymatisk nedbrytning eller både och (Pitt et al, 1985; Muck, 1988; McDonald et al, 1991). Ett möjligt sätt att uppskatta den här fraktionen är att beräkna koldioxidbalansen mellan fermentationsprodukter i ensilaget och kända fermenterbara substrat inklusive WSC, aminosyror och organiska syror i grönmassan.

För en lyckad ensilering, där LAB dominerar fermentationen, krävs att anaeroba förhållanden uppnås snabbt, att det finns tillräcklig mängd fermenterbara substrat och att det finns minst 10^6 LAB per g grönmassa (Muck, 1988, Muck och Pitt, 1993). Det senare kriteriet är vanligtvis inte uppfyllt i de flesta fall (Muck och Pitt, 1993), vilket också är tydligt från den här studien. I vallensilage var antalet LAB under den önskvärda nivån för alla observationer och i majsensilage, uppnåddes nivån i endast 30 % av observationerna. Detta tyder på att LAB inte dominerade fermentationen i de flesta fall och att bristfällig information om mikrofloras sammansättning begränsade möjligheten för prediktioner.

Detaljerad information om tillgängliga och potentiellt tillgängliga fermenterbara substrat samt sammansättning av den mikrobiella fältfloran skulle förmodligen kunna möjliggöra bättre prognosmodeller. Det förefaller också troligt att vattenaktivitet borde ge bättre information än torrsubstanshalten eftersom den har en direkt inverkan på aktiviteten hos mikroorganismer (Madigan et al., 2012).

SLUTSATSER

Prognosmodeller baserade på tillgängliga variabler om grönmassans kemiska och mikrobiella egenskaper kunde i begränsad omfattning förklara fermentationsprodukternas sammansättningen i vall- och majsensilage. Bästa förklaringsgraden erhöles för ättiksyra i vallensilage och mjölksyra och etanol i majsensilage. Torrsubstans- och råproteinhalt hade starkast inverkan på fermentationsprodukterna i både vall- och majsensilage.

Publikationer

Mogadiniyai Kasmaei, K., Rustas, B. O., Spörndly, R. and Uden, P. 2013. Prediction models of silage fermentation products on crop composition under strict anaerobic conditions: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, vol. 96: 6644-6649.

Mogodiniyai Kasmaei K, Rustas B, Udén P. 2012. The relationship between crop composition and silage fermentation products under well-controlled ensiling condition. . *Proceedings of XVI International Silage Conference*. Hämmenlinna, Finland. *Proceedings of the XVI International Silage Conference* pp.198-199.

Slutsatser (gällande nytta med råd till näringen)

Ensilage är det viktigaste fodret till producerande idisslare i Sverige. Kvaliteten bestäms i stor utsträckning under ensileringsprocessen och kan avläsas i de fermentationsprodukter som bildas och återfinns i det färdiga ensilaget. Fermentationsprodukterna påverkar såväl djurens konsumtion som mjölksammansättning och mjölk kvalitet.

Syftet med det här projektet var att ta fram modeller för att kunna förutsäga det färdiga ensilagens kvalitet utifrån kunskap om den färska grödan. De prognosmodeller som arbetades fram i projektet baserade på tillgänglig information om grönmassans kemiska sammansättning och den mikrobiella fältfloran i grödan. Modellerna kunde i begränsad omfattning förklara fermentationsprodukternas sammansättningen i vall- och majsensilage. Bästa förklaringsgraden erhöles för ättiksyra i vallensilage och mjölksyra och etanol i majsensilage. Torrsubstans- och råproteinhalt hade starkast inverkan på fermentationsprodukterna i både vall- och majsensilage. Ju torrare ensilage desto mindre fermentationsprodukter i ensilaget.

För att ta fram prediktionsmodeller med hög förklaringsgrad krävs mer information om den mikrobiella fältfloran som finns i grödan och metoder för att kunna beskriva förjäsningssubstratets tillgänglighet under hela ensileringsprocessen. Inga konkreta råd kan därför ges i dagsläget hur man skall kunna utnyttja egenskaper hos grödan för att förutsäga ensilagekvaliteten.

Den viktigaste nyttan från det här projektet är insikten att det behövs bättre sätt att beskriva grödan och den mikrobiella fältfloran för att göra förutsägelser om ensileringsresultatet och därmed vilka åtgärder som är nödvändiga i olika situationer. Som en direkt följd av resultaten i denna studie har ny forskning påbörjats vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU. Ett projekt är finansierat av SLF där syftet är att på ett systematiskt sätt reda ut olika faktorerens betydelse på ensileringsresultatet.

Resultatförmedling till näringen

Eftersom inga tydliga resultat har erhållits från projektet har resultaten inte förmedlats som var tänkt till näringen.

Referenser

- Andersson, R., and B. Hedlund. 1983. HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 176:440–443.
- Broderick, G. A., and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J. Dairy Sci.* 63:64–75.
- Chai, W., and P. Udén. 1998. An alternative oven method combined with different strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Anim. Feed Sci. Technol.* 74:281–288.
- Huhtanen, P., J. I. Nousiainen, H. Khalili, S. Jaakkola, and T. Heikkilä. 2003. Relationships between silage fermentation characteristics and milk production parameters: Analyses of literature data. *Livest. Prod. Sci.* 81:57–73.
- Huhtanen, P., M. Rinne, and J. Nousiainen. 2007. Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. *Anim.* 1:758–770.
- Leibensperger, R. Y., and R. E. Pitt. 1987. A model of clostridial dominance in ensilage. *Grass Forage Sci.* 42:297–317.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. A. Stahl, and D. P. Clark. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. Pearson Education, Inc., San Francisco, USA.
- Mason, G. 1987. Coping with collinearity. *Can. J. Program Eval.* 2:87–93.
- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Chalcombe Publications, Bucks, UK.
- Muck, R. E. 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. *J. Dairy Sci.* 71:2992–3002.
- Muck, R. E., and R. E. Pitt. 1993. Ensiling and its effect on crop quality. Page 57–66 in *Proc. National Silage Production Conference*, New York, USA.
- Pitt, R. E., R. E. Muck, and R. Y. Leibensperger. 1985. A quantitative model of the ensilage process in lactate silages. *Grass Forage Sci.* 40:279–303
- Randby, Å. T., I. Selmer-Olsen, and L. Baevre. 1999. Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. *J. Dairy Sci.* 82:420–428.
- Seale, D. R., G. Pahlow, S. F. Spoelstra, S. Lindgren, F. Dellaglio, and J. F. Lowe. 1986. Methods for the microbiological analysis of silage. Page 147–164 in *Proc. Eurobac Conference*, Uppsala, Sweden.
- Udén, P. 2006. *In vitro* studies on microbial efficiency from two cuts of ryegrass (*Lolium perenne*, cv. Aberdart) with different proportions of sugars and protein. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:145–156.
- Udén, P. 2010. The influence of sample preparation of forage crops and silages on recovery of soluble and non-structural carbohydrates and their predictions by Fourier transform mid-IR transmission spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160:49–61.
- Wilkinson, J. M., P. F. Chapman, R. J. Wilkins, and R. F. 1981. Interrelationships between pattern of fermentation during ensilage and initial crop composition. Page 631–634 in *Proc. 14th International Grassland Congress*, Lexington, USA.
- Weissbach, F., L. Schmidt, and E. Hein. 1974. Method of anticipation the run of fermentation in silage making, based on the chemical composition of green fodder. Page 226–236 in *Proc. 12th International Grassland Congress*, Moscow, Russia.