

Huvudsökande Kjell Holtenius

GLYCEROL SOM FODERTILLSKOTT NÖTKREATUR

Glycerol är ett livsnödvändigt ämne som ingår i ämnesomsättningen. Det behövs för att både växter och djur ska kunna lagra energi i form av fett. Glycerol är ett energirikt näringsämne som bidrar med 14,8 MJ omsättbar energi /kg för idisslare och kan omvandlas till glukos i levern via glukoneogenesen.

Glycerol bildas även som restprodukt vid industriell framställning av rapsmetylester (RME), en förening som utvinns från raps och som kan användas som en energitillsats i dieselolja. I och med att produktionen av RME har ökat så glycerol blivit billigare och tillgänglig i stora volymer. Råglycerol som utvinns från produktionen innehåller förutom glycerol även bland annat vatten, fett och metanol. Råglycerol är betydligt billigare än den raffinerade produkten och därför extra intressant som foder till kor. Oss veterligen har ingen tidigare jämfört rå och raffinerad glycerol som fodermedel vare sig till nötkreatur eller andra arter.

I ett flertal, både *in vitro* och *in vivo* studier har man visat att glycerol kan omsättas till flyktiga fettsyror (VFA) i våmmen. (Johns, 1953; Hobson & Mann, 1961; Czerkawski & Beckenbridge, 1972; Remond et al. 1993; Bergner et al., 1995). Dessa tidigare studier har visat att glycerolen huvudsakligen omvandlas till propionsyra. En sådan ökning av propionsyraandelen är vanligtvis önskvärd. Det bara är propionsyra av de flyktiga fettsyromna som kan omvandlas till glukos och den mjölkproducerande kon behöver stora mängder glukos främst för att bilda laktos till mjölken. Dessutom minskar metanbildningen i våmmen då propionatbildningen ökar (Czerkawski & Beckenbridge, 1972). Detta ökar den omsättbara energin i fodret och minskar skadligt metanutsläpp i miljön. I vissa studier har man dock funnit att inte bara propionatandelen ökar utan även halten av smörsyra ökar som en effekt av glyceroltillförsel. (Fisher et al., 1973; Remond et al., 1993). Höga halter av smörsyra i våmmen kan påverka foderkonsumtionen negativt och bidra till förhöjda halter av ketonkroppen betahydroxismörsyra i blodet. *In vitro*-studier har visat att glycerol i relativt höga koncentrationer kan hämma mikroorganismernas förmåga att smälta såväl fibrer som protein vilket leder till en nedsatt smältbarhet av fodrets torrs substans (Roger et al., 1992; Paggi et al., 1999; 2004). Detta har dock inte verifierats i *in vivo*-undersökningar. Råglycerol innehåller små mängder metanol. Om metanolhalten i våmmen blir för hög hämmas framförallt de bakterier som bryter ned fibrer (Cladwell, 1989). Vissa bakteriestammar hämmades redan vid en koncentration på 0.01 % i våmmen. Det är därför viktigt att metanolhalten är låg i glycerol som används som foder till kor.

Friska kor som dagligen fick glycerol inblandat i fullfodret under sex veckor med början tre veckor före kalvning ett signifikant lägre foderintag än de kontrollkor som inte fick glycerol (DeFrain et al., 2004). Den glycerolkälla som användes innehöll 1,3 % metanol. Ingen effekt på mjölkavkastningen observerades. Denna studie tycks vara den enda som publicerats där man undersökt effekter av glycerolinblandning i fodret till mjölkkor under perioden runt kalvning.

Det tycks vara allmänt vedertaget att absorptionen från våmmen är begränsad, med det saknas studier som syftar till att kvantifiera upptaget från våmmen. Ur näringsmässig synpunkt vore det bra om glycerol kan absorberas från våmmen eftersom glycerol kan omsättas till glukos i levern och lakterande mjölkkor har ett stort glukosbehov för att kunna upprätthålla syntesen av laktos i juvret.

Hypoteser

- Foderintaget hämmas inte att vare sig om råglycerol** eller ren glycerol* blandas i fodret.
- Det är ingen skillnad i smältbarheten av fodrets torrsubstans, råprotein- och fiberfraktion mellan råglycerol** och ren glycerol*.
- Mjölkvastningen ökar och fetthalten i mjölken minskar både när råglycerol** och ren glycerol* blandas i fodret.
- Glycerol resorberas inte från våmmen

*Ren glycerol: >99,5 % glycerol

**Råglycerol: 86-88 % glycerol, 8-9 % vatten, 2-3 % fett och <0,5 % metanol

MATERIAL OCH METODER

Glycerolresorptionsstudier

In vivo-momentet

Tre våmfistulerade kor som inte var inte dräktiga eller lakterande utnyttjades. Korna utfodrades med 4 kg hö, 1,25 kg kraftfoder samt halm. De tre korna fick en bolusdos som innehöll 500 g raffinerad glycerol och en vätskelöslig markör. Prov från våmvätska togs 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 och 360 min efter dosen.

In vitro-momentet

För att fastställa hur stor del av glycerolen som omsattes av våmmikroberna gjordes ett *in vitro* försök enligt en metod utvecklad av Udén (2009). Våmvätskan från två av de tidigare använda våmfistulerade korna användes då. Två isolerade och temperaturreglerade jäsrör gasades med koldioxid. Rören fylldes med ca 10 kg våmvätska. Prover efter 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 och 240 min.

Isolerade våm-momentet.

Samma kor som ovan beskrivna *in vivo* moment utnyttjades. Momentet genomfördes som ett 3x3 change-over försök med tre olika glycerolnivåer. Våmmen tömdes helt och tvättades med buffertlösning. Sedan tillsattes 10 liter av en buffertlösning som innehöll 15, 30 eller 45 mmol/l. Prover togs 10, 20, 30, 40, 50 och 60 min efter att glycerol-buffertlösningen givits. Resorptionen av glycerol beräknades därefter. För en mer detaljerad beskrivning de använda metoderna se Holtenius et al., 2009.

Försök: in sacco smältbarhet

Fyra lakterande våmfistulerade kor, andrakalvare och äldre i mitt-laktation studerades. Korna fodrades med ensilage och kraftfoder Alla korna fick tre olika behandlingar och varje behandlingsperiod var två veckor. Behandlingarna utgjordes av råglycerol, raffinerad glycerol samt ett kontroll-led då korna inte fick någon glycerol. Varje försöksperiod bestod av 12 dagars adaptationsperiod och två dagar för provtagning. Korna fick glycerol två gånger/dag via fisteln, 250 g glycerol blandades med 200 ml vatten. Den rena glycerolen hade en renhet på > 99,5 % glycerol medan den råa, oraffinerade, glycerolen bestod av 88,1 % glycerol, 9,3 % vatten, 0,9 % aska och 8000ppm metanol.

Korna var uppdelade i två par. Den första perioden var gemensam kontroll för de båda paren och därefter utfördes behandlingar med rå- respektive raffinerad glycerol enligt en change-over modell.

Dag 12 samlades våmvätska innan glyceroltillsats samt efter 2, 4, 8 och 12 timmar. pH registrerades. Därefter ett *in sacco* försök. Påsar som torkad och malet ensilage inkuberades i våmmen under 0, 2, 4, 8, 16, 24 respektive 48 timmar. Innehållet sparades för analys av TS, NDF och råprotein.

Försök: Effekter av glycerolkvalitet på kors metabolism och produktion

Trettio kor, förstakalvare och äldre studerades under de fyra första veckorna efter kalvning. Alla korna hade fri tillgång till ensilage. Kraftfodret trappades upp från tre till tio kg ts. Korna allokerades slumpmässigt till en av tre olika behandlingar. Dessa bestod av: 1. 0,5 kg rå glycerol/dag, 2. 0,5 kg raffinerad glycerol/dag eller 3. Inget glyceroltillskott. Glycerol givan delade upp i två lika stora portioner som hölls ovanpå kraftfodret. Foderkonsumtion och mjölkavkastning registrerades. Blodprover togs en gång i veckan för analys av glukos, NEFA, glycerol och insulin. För en mer detaljerad beskrivning av material och metoder se Werner Omazic (2009).

Resultat

Glycerolresorptionsstudier

In vivo-momentet

Glycerol försvann snabbt från våmmen. Det fraktionella försvinnandet varierade mellan 43 – 54% /timme hos de tre korna. Dessa värden representerar det totala försvinnandet via de tre möjliga vägarna *in vivo*: a. via avflöde genom bladmagsöppningen, b. via mikrobiell diestion, samt c. via resorption. Avflödet via löpmagen kan bestämmas genom mäta avflödet av den vätskelösliga markör som vi tillförde. Glycerolavflödet via bladmagsöppningen antas motsvara avflödet av markören. Avfödet via bladmagen varierade mellan 7,2-8,4 %/timme hos de tre korna.

In vitro-momentet

Glycerolförsvinnandet i *in vitro*-systemet förutsätts representera den mikrobiella omsättningen av glycerol. Försöket genomfördes i ett duplikat. Försvinnandet var 6,6 respektive 10,8 % /timme i de två makro *in vitro* rören.

Isolerade våm-momentet.

Absorptionen av glycerol under de 60 minuter som registreringen pågick beräknades enligt ekvationen: $A=(V_0 \cdot K_0)-(V_{60} \cdot K_{60})$ där A är absorptionen (mmol/h), V_0 , K_0 , V_{60} and K_{60} är volymen av vätska i våmmen och koncentrationen av glycerol vätskan vid tiderna 0 och 60 min. Volymen i vätskan kunde bestämmas med hjälp av koncentrationen av den vätskelösliga markören. Förhållandet mellan glycerolkoncentrationen i våmmen och absorptionshastigheten framgår av figur 1.

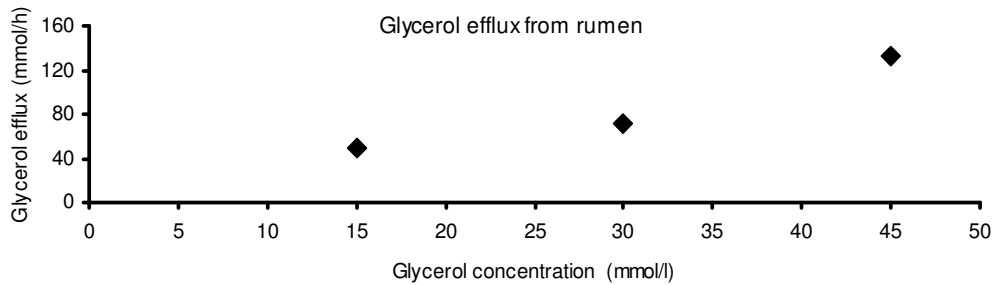


Figure 1. Relationship between the glycerol concentration in artificial rumen fluid and glycerol efflux. Points are means of data from three cows.

Försök: Effekter av glycerolkvalitet på kors metabolism och produktion

Det var ingen skillnad mellan behandlingarna i ts intag av foder ($P=0,62$). De kor som fick tillskott av raffinerad glycerol hade något högre mjölkavkastning under de två först veckorna efter kalvning ($P<0.05$) Figur x. Vare sig mjölkens fett- eller proteinhalt påverkades av glyceroltillskotten. Det var heller ingen skillnad mellan behandlingarna i halterna av insulin, NEFA, glukos eller glycerol.

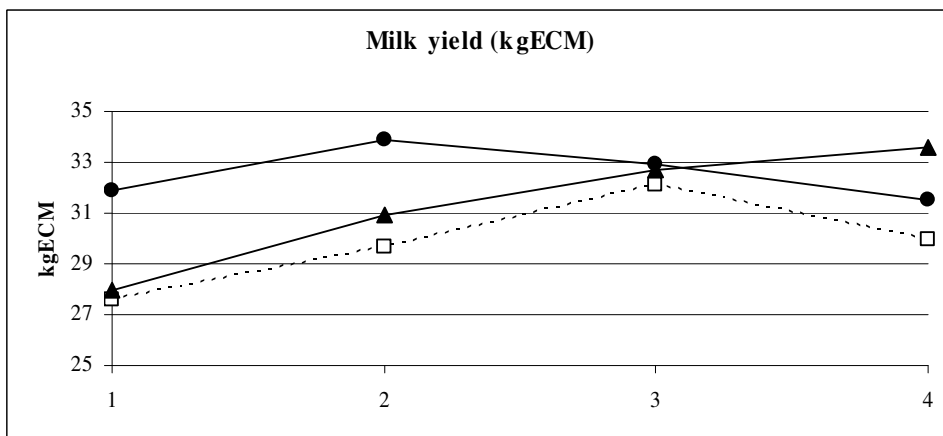
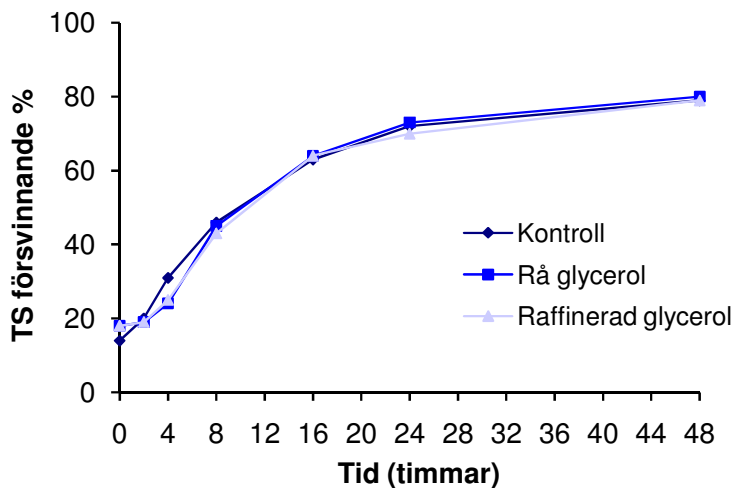


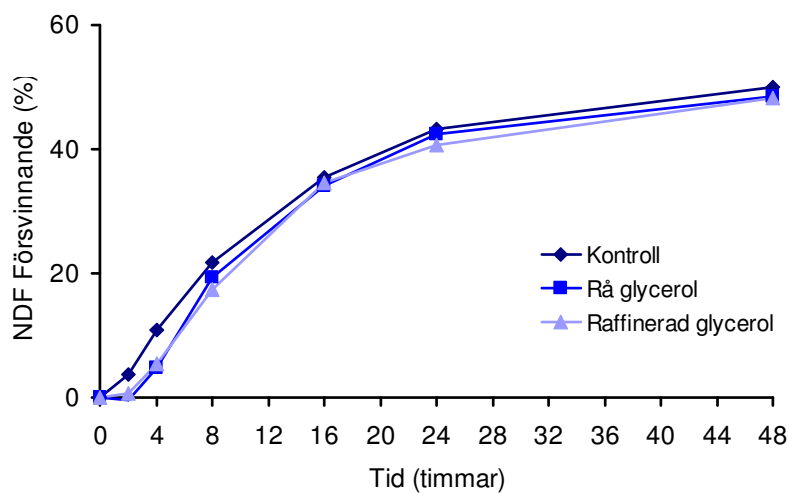
Figure 2. Daily milk yield (kg ECM¹) for dairy cows fed a silage and concentrate diet with supplementation of raw glycerol (□), refined glycerol (●) or no glycerol (▲). Mean values for week 1, 2, 3 and 4 of lactation.

In sacco smältbarhetsmomentet

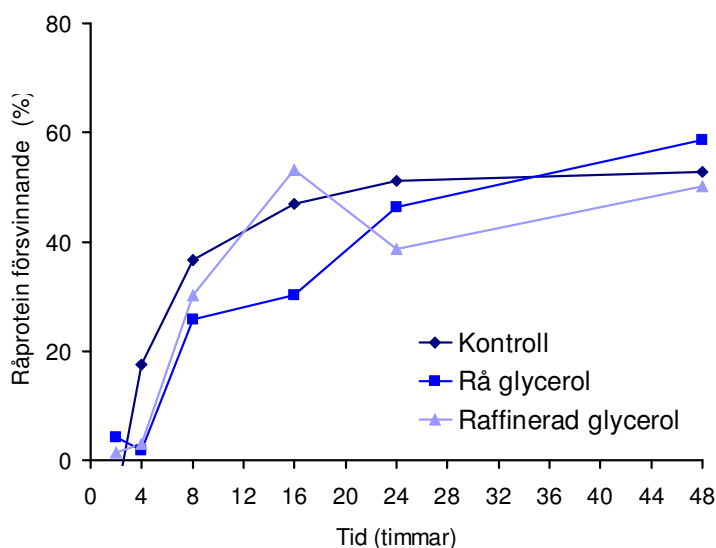
Det kumulativa försvinnandet av torrsubbans, ND fibrer och råprotein från torkad och malen ensilage inkuberat i våmmen hos kor som antingen fått tillskott av rå glycerol, raffinerad glycerol eller inget glyceroltillskott alls framgår av figurerna 3-5. Det var ingen signifikant effekt av glyceroltillskott på försvinnandet av någon av parametrarna.



Figur 3. Genomsnittligt försvinnande av TS från ensilage inkuberat i våmmen angivet i procent av tvättat 0-prov. Data presenterat som Least square means N=4 kor



Figur 4 . Genomsnittligt försvinnande av NDF från ensilage inkuberat i våmmen angivet i procent av tvättat 0-prov. Data presenterat som Least square means N=4 kor



Figur 5. Genomsnittligt försvinnande av råprotein från ensilage inkuberat i våmmen angivet i procent av tvättat 0-prov. Data presenterat som Least square means N=4 kor

I *in sacco*-studien registrerades även halten av VFA i våmvätskan (Tabell 1). Den totala halten av VFA och andelen propionat var högre hos kontrolldjuren än hos de som fick någon av de två glycerolkvaliteterna. Den högre andelen propionat motsvarades av en mindre butyrat. Det var inga signifikanta skillnader mellan behandlingarna i våm pH.

	Kontroll	Rå	Raffinerad	SEM
Total mmol/l	138.7 ^a	105.3 ^b	107,5 ^b	5.962
Acetat %	67.8	66.5	66.25	0,84
Propionat %	20.25 ^a	17.00 ^b	16.50 ^b	0.449
Butyrat %	12.00 ^a	16.25 ^b	17.00 ^b	0.795

Värden inom rad som följs av olika bokstäver (a & b) skiljer sig signifikant åt (P< 0,05)

Diskussion

Det vore mycket fördelaktigt om glycerol kan resorberas från våmmen. En mindre del skulle då omsättas av våmmens mikroorganismer. Resorberad glycerol kan omsättas till glukos via glukoneogenesen. Inget annat substrat omvandlas mer effektivt till glukos än glycerol. Dessutom så bildas ingen metan vilket sker vid den mikrobiella omsättningen om glycerol resorberas. Det tycks dock generellt förutsättas att huvuddelen av den glycerol som mjölkkor och andra idisslare konsumerar omsätts av våmmens mikroorganismer och endast en liten del resorberas över våmepitelet. Våra resultat tyder däremot på att den mikrobiella omsättningen av glycerol sker relativt långsamt och att en inte obetydlig del resorberas över epitelet. Emellertid finns det potentiella felkällor i våra studier. Det är möjligt att de *in vitro* system som vi använt för att studera den mikrobiella nedbrytningen underskattar *in vivo* nedbrytningen. Men det makrosystem som vi använt borde spegla den sanna metabolismen bättre än de små *in vitro* rör som vanligtvis används. Den *in vivo* modell med tömd och tvättad våm som vi använt har

också brister. Trots noggrann tvätt med buffert kan man förutsätta att det finns mikroorganismer kvar på våmepitelet. Dessa mikroorganismer skulle kunna digenera en del glycerol vilket leder till en överskattning av försvinnandet via absorption. Vidare kan det inte uteslutas att en del glycerol försvann via bladmagsöppningen. Det faktum att den markör vi använde minskade i koncentration enligt ”nollte ordningen” tyder dock på att så inte var fallet. Vi kommer under våren att studera glyceroltransporten över våmepitelet med ussing-teknik där små epitelbitar från avlivade djur utnyttjas. Transporten av radioaktivt inmärkt glycerol över epitelet studeras. Dessa studier kommer att genomföras i samarbete med professor Holger Martens, Freie Universitet Berlin, Tyskland. Vi hoppas att vi därmed ska kunna fastslå att glycerol kan resorberas från våmmen.

Eftersom råa oraffinerade glycerolkvaliteter är betydligt billigare än raffinerade så är det fördelaktigt om rå glycerol kan användas som fodermedel. Resultaten från våra studier tyder inte på några klara negativa effekter av att använda rå glycerol. Det var inga signifikanta skillnader i vara sig nedbrytningen av torrsbstans, fibrer eller råprotein mellan glycerolkvaliteterna. Inte heller skiljde VFA-mönstret i våmväska mellan någon av behandlingarna. Det utfodringsförsök som genomfördes visade att ämnesomsättningen inte påverkades av om korna fick tillskott av vara sig rå eller raffinerad glycerol. Foderkonsumtionen påverkades inte heller av glyceroltillskotten. Det var positivt att tillskott av rå glycerol inte hämmade foderintaget. De kor som fick raffinerad glycerol hade en högre mjölkavkastning under de första två veckorna efter kalvning än både de kontrollkor som inte fick något glyceroltillskott och de kor som fick rå glycerol. Det var däremot ingen signifikant skillnad i mjölkens sammansättning mellan grupperna. Vi vill dock understryka att det sammansättningen av rå glycerol kan variera och det går inte att utesluta att råglycerol av sämre kvalitet än den vi använde i dessa studier kan medföra negativa effekter för de djur som konsumerar sådan rå glycerol

Referenslista

- Allen, L., Wingertzahn, M., Teichberg, S. et al. 1998. Proabsorptive effect of glycerol as a glucose substitute in oral rehydration solutions. *J. Nutr. Biochem.* 10, 49-55.
- Bergner, H., Kijora, C., Ceresnakova, Z. et al. 1995. In vitro undersuchungen zum glycerinumsatz durch pansenmikroorganismen. *Arch. Anim. Nutr.* 48, 245-256.
- Caldwell, D. 1989. Effects of methanol on the growth of gastrointestinal anaerobes. *Can. J. Microbiol.* 35, 313-317.
- Czerkawski, J. & Beckenbridge, G. 1972. Fermentation of various intermediates and other compounds with particular reference to methane production.
- DeFrain, J., Hippen, A., Kalscheur, K & Jardon, P. 2004. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. *J. Dairy Sci.* 87, 4195-4206
- Fisher, L., Erfle, J., Lodge, G. & Souer, F. 1973. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. *Can. J. Anim. Sci.* 53, 289-296.
- Garthwaite, B., Drackley, J., McCoy, G. & Jaster, E. 1994. Whole milk and oral rehydration solution for calves with diarrhoea of spontaneous origin
- Hobson, P. & Mann, S. 1961. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of sheep. *J. Gen. Microbiol.* 25, 227-240.
- Horst, R. & Goff, J. 2003.
- Johns, A. 1953. Fermentation of glycerol in the rumen of sheep. *New. Zeal. J. Sci. Technol.* 35, 262-269

- Kohno, M., Murayama, I., Sawamukai, K & Sato, S. 2004. Blood component changes and therapeutic effects produced in ketotic cows by orally administered glycerol. *J. Japan Vet. Med. Ass.* 57, 165-169.
- Larson, L., Owen, F., Albright R. et al. 1977. Guidelines toward a more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. *J. Dairy. Sci.* 60, 989-998.
- Liversey, G. & Elia, M. 1988. Estimation Of energy expenditure, net carbohydrate utilization and non-fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: Evaluation of errors with special reference to detailed composition of fuels. *Am. J. Clin. Nutr.* 47, 608-628.
- McGuirk., S. 1998. New approach to electrolyte therapy. *Cattle Practice.* 6, 67-69.
- Paggi, R., Fay, J., Faverin, C. 2004. In vitro ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol. *J. Agric. Sci.* 142, 89-96.
- Paggi, R., Fay, J., Fernandez, H. 1999. Effect of short chain acids and glycerol on the proteolytic activity of rumen fluid. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 78, 341-347.
- Pehrson, B. 1972. The effect of orally administered glycogenic substance to dairy cows. II. Single oral administration of large doses of Na propionate and glycerol to healthy, starved cows and to cows with ketosis. *Nord. Vet. Med.* 24, 417-22.
- Phillips, R. 1985. Fluid therapy in diarrheic calves what, how and how much. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1, 157- 163.
- Radostits, O., Gay, C., Blood, D. & Hinchcliffe, K. 2000. *Veterinary Medicine.* W. B. Saunders, London. 9th ed, p.
- Remond, B., Souday, B. & Jouany, J. 1993. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 41, 121-132.
- Roger, V., Fonty, G. & Gouet, P. 1992. Effects of glycerol on the growth, adhesion and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. *Curr. Microbiol.* 25, 197-201.
- Svensson, C., Lundborg, K. Emanuelson, U. Et al. 2003. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectioiud diseases. *Prev. Vet. Med.* 58, 179-197.
- Westenfelder, C., Arevalo, G., Crawford, P. et al. 1980. Renal tubular function in glycerol-induced renal failure. *Kidney Int.* 18, 432-444.

Publikationer

Werner Omazic, A, Bertilsson, B., Tråvén, M. and Holtenius, K. 2009. Dietary glycerol supplementation to dairy cows – effects on lactation performance and metabolism. Proc. 11th Interational Symposium on Ruminant Physiology Clermont Ferrand, Frankrike

Holtenius, K. Werner Omazic, A. and Kronqvist C. 2009
The fate of glycerol entering the rumen of dairy cows. Proc. 11th Interational Symposium on Ruminant Physiology Clermont Ferrand, Frankrike

Kullberg, Karin. 2008§. Glycerol till mjölkkor – effekter på våmmetabolismen. Masters arbete inst. för Husdjurens utfodring och vård, Uppsala

Övrigt

Detta projekt ingår som en väsentlig del i Anna Werner Omazics doktorandarbete. Anna har varit föräldraledig en stor del av projektet. Projektet har därför fortskridit något långsammare än planerat. Vi avser att resultaten av projektet kommer att förmedlas både i fora riktade mot näringen och till det internationella vetenskapliga samfundet. Observera att projektet är ändrat enligt de särskilda villkor som angivits i bidragskontraktet.