

Slutrapport för SLF-projekt Mjolkproduktion V0830411 - Analys av lättillgängliga kolhydrater och vatten i ensilage och grönmassa

Peter Udén

Avdelningen för fodervetenskap

Institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU

Kungsängens forskningscentrum

753 23 Uppsala, Sweden

1. Bakgrund

Gräs, klöver och helsäd innehåller socker och helsäd av spannmål och trindsäd innehåller dessutom betydande mängder stärkelse, f.a. i senare mognadsstadier (Aufrère et al., 1992).

Fruktaner finns främst i C3-gräs och klassas oftast som socker för idisslare pga. en hög nedbrytningshastighet (Van Soest, 1994). Socker och stärkelse utgör den största andelen av de så kallade icke-strukturella kolhydraterna (NSC) och påverkar fibernedbrytningen negativt (Khalili och Huhtanen, 1991).

Normalt extraheras socker i vatten före analys men för samtidig analys av stärkelse i helsäd fordras en acetatbuffert. Det vore därför lämpligt om dessa medier vore jämförbara med avseende på sockerextraktionen.

Ugnstorkning är det normala prepareringsförfarandet vad gäller socker- och stärkelseanalyser trots att flera forskare visat på betydande förluster med denna metod jämfört med frystorkning (Deinum och Maassen, 1994; Nielsen et al., 2007; Pelletier et al., 2010). Vare sig ugn- eller frystorkning av prover är ett alternativ om även flyktiga ämnen (ammoniak, alkoholer och delvis syror) i ensilage också skall analyseras. Dessa måste i stället extraheras direkt från det färskaste provet genom pressning eller urlakning med vatten. Det finns lite information om sockeranalys på extrakt från otorkade prover från pressning eller urlakning med kallt vatten vilket skulle vara ett arbetsbesparande alternativ om även fermentationsprodukter skall analyseras.

Preliminära resultat (Udén, 2009a) har visat lovande resultat av samtidig analys av fermentationsprodukter och socker med FTIR-spektroskopi (*Fourier Transform (mid) infrared*) i ensilageextrakt. Dessa resultat tyder på att en enkel extraktion, följt av FTIR-analys, kan vara en kostnadseffektiv och snabb analysmetod.

Målet med denna studie var att: i) jämföra fyra olika extraktions- och prepareringsmetoder för lösligt socker i vallväxter, ii) jämföra hetvattensextraktion med acetatbuffertextraktion för vallväxter och iii) kalibrera ett FTIR-instrument mot extraherbart socker och stärkelse.

2. Material och metoder

En fullständig beskrivning av material och metoder finns beskriven av Udén (2010). Nedan följer en synopsis.

Prover och provberedning

Tjugofyra direktskördade eller förtorkade klöver-gräsprover insamlades i Sverige och Norge bestående av 16 gräsprover, 4 klöver-gräsblandningar, 1 kärringtand samt 12 helgrödor av vete (2), korn (2), havre (2), majs (4) och ärter (2). Hälften var i form av grönmassa och hälften ensilage. Alla prover var frusna, maldes frusna på köttkvarn, blandades och delades upp var för sig så att 1/3 ugnstorkades (ODR) i 16 timmar vid 60°C, 1/3 frystorkades (FDR)

och en 1/3 frystes ner igen (FF). De frusna proverna av extraherades antingen i kokande eller rumstempererat vatten (klöver-gräs) eller i acetatbuffert (helsäd). Alla torkade prover maldes på ett 1-mm's såll före vidare extraktion och analys.

Extraktion av lösligt socker [Su(s)]

Provmängder, extraktionsvolym, tider och temperaturer visas i Tabell 1. Lösligt socker antogs bestå av glukos, fruktos, sukros, fruktaner och, som det senare visade sig, även av löslig stärkelse i helgrödan. Prover togs från alla extrakt för enzymatisk- och FTIR-analys.

Tabell 1. Extraktionsspecifikationer

Prov	Behandling ^a	Vikt (g)	Lösn.medel	Volym (mL)	Temp. ^b	Tid
Klöver-gräs	ODR, FDR	2	Vatten	100	100°C	3 min
Klöver-gräs	FF	10	Vatten	100	100°C	3 min
Klöver-gräs	FF	100	Vatten	100	20°C	30 min
Klöver-gräs	ODR, FDR	0.7	Acetat	30	60°C	40 min
Helgröda	ODR, FDR	2	Acetat	100	60°C	40 min
Helgröda	FF	10	Acetat	100	60°C	40 min

^aODR = ugnstorkat; FDR = frystorkat; FF = otorkat.

Enzymatiska analyser

Alla extrakt analyserades för Su(s) enligt Udén (2006). Dessutom analyserades extrakt av helgrödor även för summan av Su(s) och löslig stärkelse [St(s)] efter att extrakten hydrolyserats enligt Sveinbjörnsson et al. (2007). Även analys av olöslig stärkelse [St(i)] gjordes enligt Sveinbjörnsson et al. (2007) som i första steget gav ett värde på NSC. Halten St(i) beräknades sen som $NSC - \Sigma(Su(s) + St(s))$.

Analys av torrs substans (TS) och vatten

Analys av ts av lufttorra prover gjordes genom torkning i 16 timmar i fläkttorkskåp vid 105°C. Extrakt av från FF-prepareringen med rumstempererat vatten gjordes genom Karl Fisher-titrering. Detta möjliggjorde korrektion av extraktvolymerna som inte är identiska med tillsatt volym vatten.

FTIR- analys

Spektra erhöles från samtliga extrakt (vatten och acetat) samt efter amylasnedbrytning av helgrödor. Helgrödorna preparerades enligt Udén (2009b). Ett standardinstrument för mjölkkanalys (FT120, Foss Electric A/S, Hillerød, Danmark) användes för skanning av extrakten.

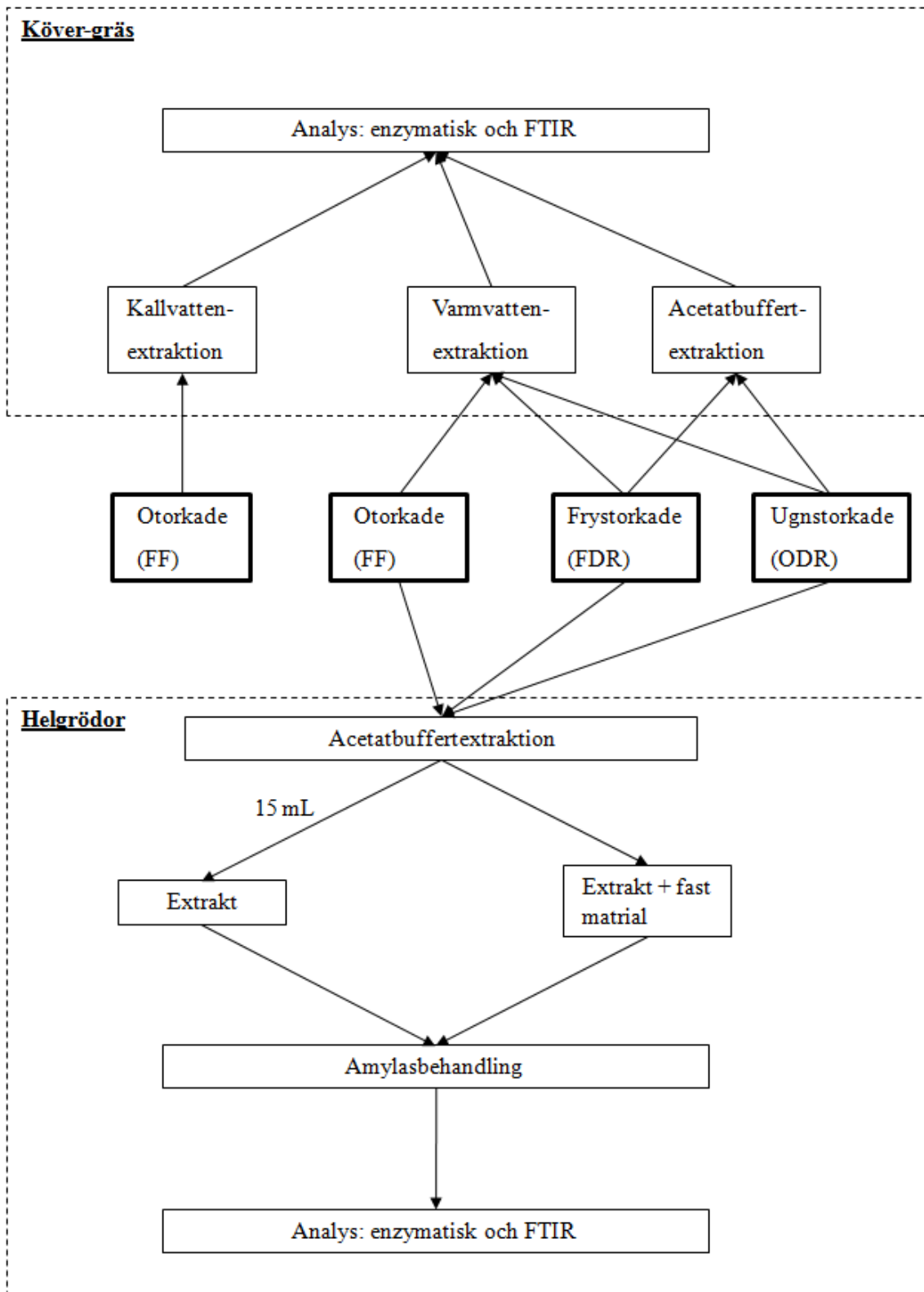


Fig. 1. Flödesschema för preparering och extraktion av samtliga prover.

Beräkningar och statistiska analyser

Alla extrakt korrigerades för utspädning och beräknades på färskbasis för att undvika påverkan av andra förluster, t.ex. vid torkning, i form etanol, ammoniak, mm.

Variansanalys utfördes på de enzymatiska analysdata (GLM proceduren i Minitab, v.15, Minitab Inc., State College, PA, USA). För att testa effekten av prepareringsmetod på återfunnen Su(s) efter vattenextraktion användes 96 observationer (medelvärden av duplikat) bestående av 24 klöver-gräsprover x 4 prepareringar (ODR, FDR, FF – kall eller het extraktion). För att testa effekten av lösningsmedel (vatten eller acetatbuffert) vid extraktion av Su(s) i klöver-gräsprover användes 96 observationer som utgjordes av 24 prover x 2 prepareringar (FDR och ODR) x 2 lösningsmedel. Variansanalys av helgrödornas innehåll av Su(s), St(s), St(i) samt totalstärkelse [St(tot)] utgjordes vardera av 36 observationer: 12 prover x 3 prepareringar (FDR, ODR och FF-hetvattenextraktion).

Resultaten från den enzymatiska analysen av samtliga extrakt (g/L) i duplikat användes för kalibreringar av FTIR-instrumentet. Data delades upp i vatten- och acetatextrakt. Det förra setet bestod av 191 observationer (1 uteslutet) och det senare av 239 observationer (1 uteslutet). Absorbansvärden från 191 våglängder användes vid selektion av signifikanta våglängder enligt Udén och Sjaunja (2009) med hjälp av stegvis regression (Minitab, v. 15, Minitab Inc., State College, PA, USA). Kvadratsummorna av differenserna (SSdiff) mellan predicerade och observerade värden användes som mått på kalibreringsnoggrannheten. Medelkvadratfelet (MSPE) beräknades som SSdiff/n, roten av MSPE (RMSPE) som $\sqrt{\text{MSPE}}$ prediktionsfelet och medelfelet (MPE) som RMSPE/medelvärde (observerat). Som ett mått på provernas spridning relativt till kalibreringsfelet beräknades kvoten mellan provernas standardavvikelse och RMSPE.

3. Resultat

Socker och stärkelse - översikt

Provstatistik visas i Tabell 2 för enzymatisk analys av FF-prepareringen med hett vatten (klöver-gräs) eller acetatbuffert (helgrödor). Som väntat var sockerinnehållet lägre för ensilage än för grönmassa medan St(s) och St(i) var relativt lika. Hög andelar St(s) återfanns i vissa helgrödor på upp till 64% av totalstärkelsen.

Klöver-gräsprover

Tabell 3 visar resultatet av preparerings- och extraktionsmetodens effekt på sockeranalysen. Ugnstorkning (ODR) förorsakade en 19%-ig sänkning av Su(s) jämfört med FF - hetvattenextraktion ($P < 0.05$; alla) och för ensilage var sänkningen 29% ($P < 0.05$). Extraktion med antingen vatten eller acetatbuffert resulterade inte i några mätbara skillnader (24.4 respektive 25.3 g/kg färskvikt).

Helgrödor

Små skillnader noterades mellan prepareringsmetoder för innehåll av Su(s) med 7% lägre innehåll för ODR jämfört med FDR (Tabell 4). En förvånansvärt hög och variabel andel av stärkelsen (34%) var i löslig form från 6% för ärtensilage till 85% för tidigt skördad majsgrönmassa. Det var också en högre andel i FF än i FDR-prepareringarna men för totalstärkelse fanns inga skillnader mellan prepareringsmetoderna.

Tabell 2. Innehåll av socker och stärkelse i klöver-gräs (n = 24) och helgrödor (n = 12) från otorkade prover extraherade med hett vatten (klöver-gräs) eller acetatbuffert (helgrödor) (g/kg torrsubstans)

	Su(s)		St(i)		St(s)		St(s)-andel (%)	
	Grönm.	Ensil.	Grönm.	Ensil.	Grönm.	Ensil.	Grönm.	Ensil
Klöver-gräs								
Medel	110	74						
Max	222	138						
Min	46	8						
Helgrödor								
Medel	118	29	133	131	44	37	23	25
Max	183	40	276	291	89	79	52	64
Min	50	18	32	50	24	2	2	2

Su(s) = lösligt socker (glukos, fruktos, sukros och fruktaner); St(i) = olöslig stärkelse; St(s) = löslig stärkelse; St(s)-andel.= andel St(s) av totalstärkelse.

Tabell 3. Jämförelse av preparations- och extraktionsmetod av 24 vattenextraherade klöver-gräsprover från grönmassa och ensilage på innehåll av socker (g/kg ursprunglig färskvikt)

Form	Preparation:	ODR	FDR	FF	FF	SEM	P=
	Extraktion:	Het	Het	Het	Kall		
Grönm.		25.9a	29.1	28.5	30.0b	0.85	0.012
Ensilage		19.2a	23.5ab	27.0b	23.9b	1.17	0.001
Alla		22.6a	26.3b	27.8b	27.0b	0.53	<0.001

^aODR = ugnstorkat; FDR = frystorkat; FF = otorkat; Het = hett vatten; Kall = kallt vatten; a,b = olika bokstäver skiljer sig signifikant åt (P<0.05).

Tabell 4. Jämförelse av preparationsmetod av 12 acetatbuffertextraherade helgrödor på innehåll av socker och stärkelse (g/kg färskvikt)

	ODR	FDR	FF	SEM	P=
Su(s)	21.3a	22.7b	23.2b	0.41	0.008
St(s)	9.8a,b	6.4a	15.7b	1.84	0.006
St(i)	51.2	54.7	46.9	2.34	0.086
St(tot)	61.0	61.0	62.6	0.83	0.31

^aODR = ugnstorkat; FDR = frystorkat; FF = otorkat; Su(s) = socker; St(s) = löslig stärkelse; St(i) = olöslig stärkelse; St(tot) = totalstärkelse; a,b = olika bokstäver skiljer sig signifikant åt (P<0.05).

FTIR- analys

Spektra från vatten- och acetatextraktion visas i Fig. 2 för två liknande prover. Huvudskillnaderna i spektra beror på acetatets starka absorption med toppar vid 6.34 och 7.06 μm med mindre toppar även vid 7.43 och 9.81 μm . Enbart den högsta våglängden sammanfaller med absorption för kolhydrater.

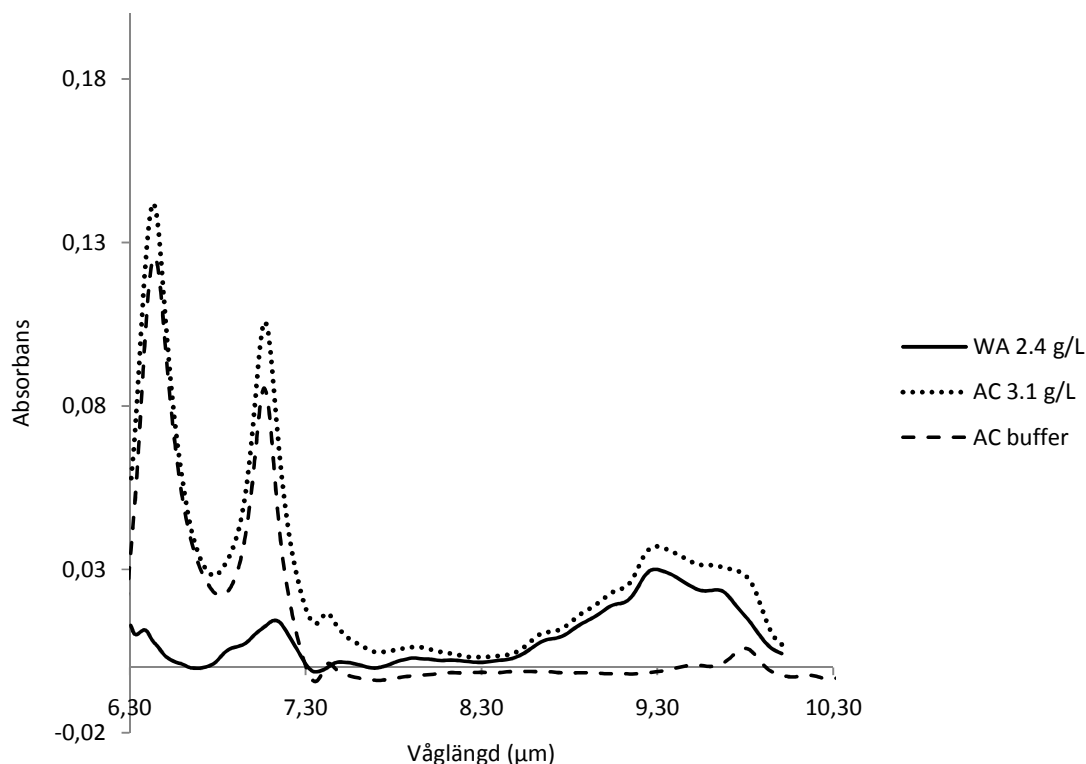


Fig. 2. Jämförelse av spektra från samma prov extraherat med vatten (WA) eller acetatbuffert (AC) samt ren acetatbuffert (AC buffer). Halterna av socker anges i figuren och skillnaderna beror på olika utspädning.

Tabell 5. Kalibreringsstatistik från Fourier transform mid-IR transmissionsspektroskopi (FTIR) mot enzymatisk analys av lösligt socker och stärkelse i vatten eller acetatbuffert och i det sammanslagna datasetet (g/L)^a

	Medel	Max	Min	SD	N	WL	SD/ RMSPE	MSPE	RMSPE	Medelfel
Vattenextraktion										
Enzymatisk	4.92	36.69	-0.18	7.56						
FTIR	4.96	35.01	-0.43	7.6	191	15	13.7	0.303	0.55	0.112
Acetatextraktion										
Enzymatisk										
sk	2.96	12.41	-0.1	2.49						
FTIR	3.02	12.22	-0.19	2.48	239	13	8.9	0.078	0.278	0.094
Sammanslaget										
Enzymatisk										
sk	3.83	36.69	-0.18	5.45						
FTIR	3.82	34.22	-0.38	5.41	430	19	12	0.205	0.453	0.118

^aSD = standardavvikelse för proverna; N = antal observationer (36 prover och 2 analyser och 3 eller 4 prepareringsmetoder per prov); WL = antal använda våglängder; MSPE = medelvarians; RMSPE = medelstandardavvikelse.

Den statistiska analysen av FTIR-kalibreringen mot enzymatisk analys visas i Tabell 5. Medelfelet var lägst för acetatextraktionerna och högst för det sammanslagna datasetet men alla var <0.13 (13%). Antalet signifikanta våglängder ($P < 0.05$) varierade från 11 för acetatextraktion till 15 för vattenextraktion. Regressionen för vattenextraktioner visas i Fig. 3.

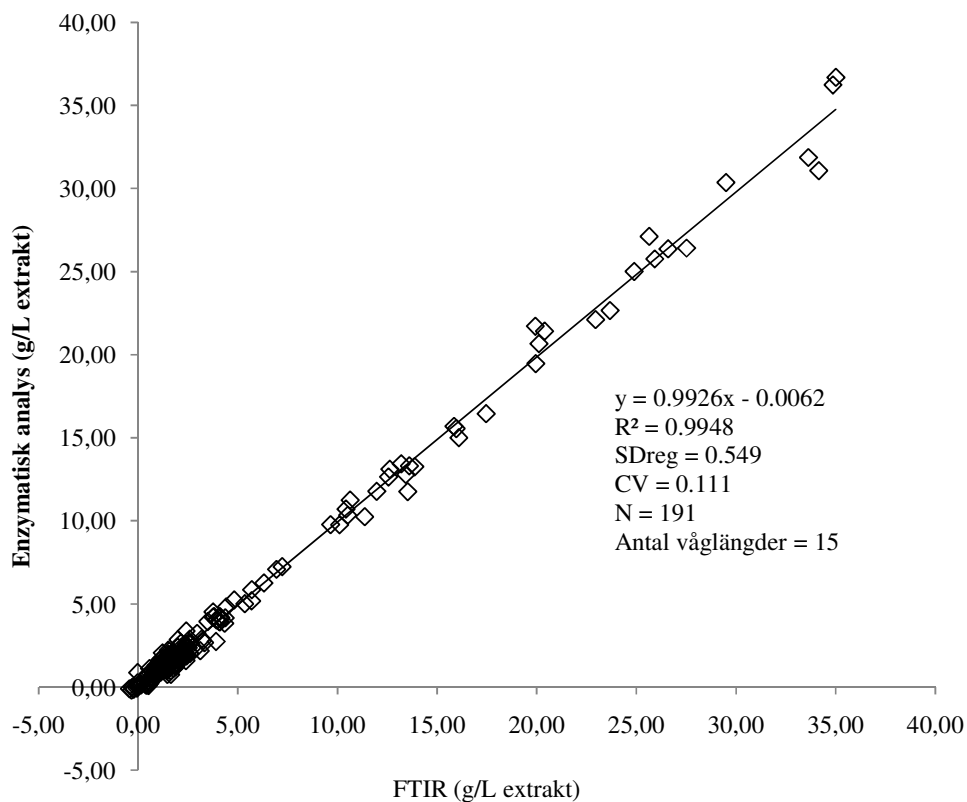


Fig. 3. Skattning av koncentrationen av socker från enzymatisk analys med FTIR

4. Diskussion

Ugnstorkning vid ca. 60°C är det vanligaste metoden för TS-analys (e.g., Undersander et al., 1993) och rekommenderas av EU (71/393/EEC) också för prov med hög vattenhalt (ISO 16472:2006 IDT). Bildning av Maillardprodukter eller karamellisering kan uppstå under torkning vid höga vilket sänker socker halten. Däremot har det ofta ansetts att socker inte kan försvinna genom avdunstning. Trots detta har flera forskare rapporterat betydande förluster vid torkning (Jones, 1962; Lancaster et al., 1977; Deinum and Maassen, 1994; Nielsen et al., 2007; Pelletier et al., 2010). Deinum and Maassen (1994) fann också att förlusterna ökade vid lägre temperatur och hänförde det till cellrespirationen. Denna teori verkade också stämma med resultat från Pelletier et al. (2010) som rekommenderade en "avdödning" av cellerna genom en 1-minuts micvågsbehandling före ugnstorkning vid 55°C eftersom detta gav samma resultat som den mer kostsamma metoden i form av frystorkning. En mikrobiell omsättning under ugnstorkning av majsensilage är också en trolig anledning till sockerförluster (Nielsen

et al., 2007) . I den föreliggande studien var skillnaderna i sockerhalter från ugn- respektive otorkade prover högre för ensilage än för grönmassa. (Tabell 4). Anledningen till detta var sannolikt att den aeroba mikrobiella nedbrytningen av socker i ensilage var mer uttalad en cellandning i grönmassan.

Det är praktiskt och ekonomiskt fördelaktigt att använda samma provpreparation både för socker och för fermentationsprodukter. Den prepareringsmetod som används för fermentationsprodukter var identisk med kallvattenextraktion av otorkade prover. Resultaten från denna metod skiljde sig heller inte från vare sig frystorkning eller hetvattenextraktion av otorkade prover och kan rekommenderas för framtiden.

Det var något överraskande att finna höga halter av löslig stärkelse i vissa helgrödor (6 – 85%). Detta har inte tidigare uppmärksammats och hade inte heller upptäckts om inte FTIR-skattningarna för sockerextrakten inte hade avvikit så markant för dessa grödor. Detta resulterade i en test av dessa extrakt med nedbrytning av eventuell löslig stärkelse till glukos, vilket resulterade i höjda sockervärden och en starkt förbättrad FTIR-kalibrering. Andelen löslig stärkelse var högst för de otorkade proverna men inga skillnader upptäcktes för det totala stärkelseinnehållet (Tabell 4). Frystorkning måste därför rekommenderas om en fraktionering av stärkelse är av intresse.

Den statistiska utvärderingen av FTIR-kalibreringarna tyder på denna metod är ett mycket lovande alternativ till den tidskrävande och kostsamma enzymatiska metoden. Ett medelfel på 10% (Tabell 5) är mer än godtagbart för praktiskt bruk och ofta tillräcklig för forskningsändamål. Extraktion av socker och fermentationsprodukter i ensilage gör att dessa kan skattas samtidigt. Lovande resultat har också presenterats för samtidig skattning av socker, alkoholer, organiska syror och ammoniak (Udén, 2009a). De är rimligt att anta att socker och stärkelse i lösning kan skattas med enklare IR-instrument av filtertyp med ett begränsat antal våglängdsfönster. Om antalet våglängder reducerades från 13 till 4, ökade medelfelet från 0.094 till 0.134 för acetatextrakten (Udén, 2010).

Resultaten från detta försök kan därför sammanfattas sålunda:

- Ugnstorkning sänker sockerhalterna framför allt i ensilage jämfört med frystorkning och analys av otorkade prover.
- En betydande del av stärkelsen kan föreligga i löslig form i helgrödor. De olika formerna kan tänkas ha olika vonnedbrytbahet.
- FTIR kan användas med gott resultat för skattning av socker och av stärkelse efter enkel hydrolys. Detta medför betydande sänkningar av analyskostnader.
-

5. Referenser

Aufrère, J., Graviou, D., Demarquilly, C., Andrieu, J., Emileb, J.C., Giovanni, R., Maupetit, P., 1992. Estimation of organic matter digestibility of whole maize plants by laboratory methods. Anim. Feed Sci. Technol. 36, 187-204.

Deinum, B., Maassen, A., 1994. Effects of drying temperature on chemical composition and in vitro digestibility of forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 46, 75-86.

Khalili, H., P. Huhtanen. 1991. Sucrose supplementation in cattle given grass silage based diet. 2. Digestion of cell wall carbohydrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 33:262-273.

Nielsen, T.S., Kristensen, N.B., Weisbjerg, M.R., 2007. Effect of harvest time on fermentation profiles of maize ensiled in laboratory silos and determination of losses at 60°C. *Acta Agr. Scand. Sect. A* 57, 30-37.

Pelletier, S., Tremblay, G.F., Bertrand, A., Bélanger, G., Castonguay, Y., Michaud, R., 2010. Drying procedures affect non-structural carbohydrates and other nutritive value attributes in forage samples. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157, 139-150.

Sveinbjörnsson, J., Murphy, M., Udén, P., 2007. In vitro evaluation of starch degradation from feeds with or without various heat treatments. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 171–185.

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., 2009a. Rapid analysis of soluble components in silage by Fourier transform (mid) infrared analysis. *Proc. XVth Silage Conf. July 27-29, Madison, Wisc.I, USA*, pp 187-188 (abstr.).

Udén, P., 2009b. Estimating residual starch from in vitro fermentations by Fourier transform mid-IR transmission spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 152, 123-132.

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. *Animal Feed Sci. Technol.* doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.06.013

Udén, P., Sjaunja, L.-O., 2009. Estimating volatile fatty acid concentrations in rumen samples by Fourier transform mid-IR transmission spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.* 152, 133-140.

6. Publikationer

Udén, P., 2010. The influence of sample preparation on the level of soluble and non-structural carbohydrates in forage crops and silages. In: *Proceedings of the 1st Nordic Feed Science Conference, Uppsala, Sweden*, P. Udén, T. Eriksson, C.E. Müller, R. Spörndly, M. Liljeholm (Eds.) Rapport 274, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU.

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. *Animal Feed Sci. Technol.* doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.06.013.

7. Övrig resultatförmedling

Till näringen deltog vid *1st Nordic Feed Science Conference* den 22-23 juni 2010.