

## **Bakgrund**

### *Allmänt*

Övergången från hö till ensilage som bas i kornas utfodring är troligen den största förändring som skett i svensk mjölkproduktion under de senaste årtiondena. Från att ha omfattat 10-20% av vallfodret under mitten av 70-talet, har andelen under de senaste åren ökat till 70-95%. Genom en tidigare skörd och ett lägre fiberinnehåll samt ökad kraftfoderanvändning har förutsättningarna för en god energiförsörjning förbättrats. Däremot har proteinutnyttjandet från ensilage ifrågasatts och ansetts vara ett problem. Under det senaste decenniet har vi också sett en negativ trend för proteinhalten i mjölk, som till stor del anses vara miljö- och då kanske främst utfodringsbetingad.

### *Ensilagetets sammansättning*

Under ensilering av gräs och baljväxter bryts främst fruktaner, sukros, proteiner, organiska syror (t. ex. citronsyra), mm. ner av de mikroorganismer, som kommer med grönmassan från fältet och/eller som tillsätts via inokulanter. Om syretillgången är låg och tillgången på lättillgängliga kolhydrater hög, tar vanligen mjölksyraproducerande bakterier över, vilket resulterar i produktion av stora mängder mjölksyra. Torrsubstanshalten avgör hur mycket substrat som förbrukas och hur mycket mjölksyra som produceras. En mängd olika organismer kan samtidigt vara aktiva i början av ensileringsprocessen. Detta resulterar i en produktion av andra ämnen som ättiksyra, smörsyra, etanol, ammoniak, 2-3-butandiol, mm. Mjölksyra och andra fermentationsprodukter kan utgöra över 10% av ensilagetets torrsubstans, men hur de skall värderas näringsmässigt är dåligt utrett.

Kemiska standardanalyser som de senaste åren utförts rutinmässigt på grovfoder består av: råprotein (N\*6.25), fiber (neutral detergent fiber; NDF) och aska. Utöver dessa analyser förekommer ibland analys av socker, stärkelse, ammoniak, otillgängligt N, mjölksyra, etanol och flyktiga fettsyror. På färskt och torkat gräs, på spannmål och vanliga proteinfodermedel utgör summan av de uppräknade analysvärden omkring 95% av torrsubstansen. Ensilage skiljer sig dock på så vis att den oförklarade resten här kan uppgå till 30% av torrsubstansen. Det är sannolikt att partiellt nedbruten hemicellulosa och lignin-kolhydratkomplex förloras vid filtreringssteget i fiberanalysen där neutrala detergent används (Udén, 2006).

### *Proteinutnyttjande*

Generellt är proteinutnyttjandet dåligt i vallfoderdominerade foderstater, där kväve (N) i mjölk i procent av N i konsumerat foder oftast är 15-25 %. Detta är bekymmersamt av flera anledningar. Dels kan det naturligtvis innebära en dålig proteinförsörjning för den högproducerande kon. Det kan också innebära stor risk för kväveförluster till miljön. Grundorsaken är att en mycket stor del av vallproteinet bryts ned i vommen utan att i motsvarande grad kunna användas på nytt i mikrobprotein. I den svenska tillämpningen av AAT/PBV-systemet har man schablonmässigt räknat med att 80% av vallproteinet bryts ner. I verkligheten kan nog siffran vara både lägre och högre. Det gemensamma fodervärderingssystem (NorFor) som nu införs i fyra nordiska länder på husdjursorganisationernas initiativ ska ge en sannare bild, men fortfarande är analysmöjligheter och kostnader en begränsning.

Råprotein är ett synnerligen grovt mått på ensilagetets proteinvärde. Andelen intakt protein minskar normalt med ökad vattenhalt i ensilaget, eftersom fermentationsgraden då ökar. Detta

försäkrar ökad nedbrytning av proteinet till ammoniak, fria aminosyror, peptider, diverse amider, mm. under ensileringen. Normalt utgörs mer än 50% av ensilagens råprotein av icke-proteinkväve (NPN) och i NPN dominerar fria aminosyror (Hedqvist & Udén, 2006; Slottner & Bertilsson, 2006). De olika NPN-fraktionerna bidrar i olika hög grad till proteinvärdet, vilket också har börjat beaktas i de moderna fodervärderingssystemen (NorFor Evaluator). Genom tillsatsmedel (spec. syror) kan man sänka andelen NPN (Slottner & Bertilsson, 2006).

Om inte fermentationen begränsas kan en stor del av de lösliga kolhydraterna omsättas till mjölksyra i ensilage med låga och måttliga ts-halter. Resultat från försök där mjölksyra infuserats i vommen (Jaakkola och Huhtanen, 1992) tyder på att mjölksyran inte kan bidra med någon energi för mikrobproteinbildning. Även om en kraftig mjölksyrafermentation ger en bra konservering så försämras samtidigt möjligheten att ta till vara kväve från nedbrutet foderprotein och bygga upp mikrobprotein som kan utnyttjas av djuret. I de finska försöken är det vanligen höga tillsatser av myrsyra (~8 l/ton) som har begränsat fermentationen.

### *Snabba och billiga analyser*

Om det skall bli ekonomiskt möjligt att införa ytterligare analyser av ensilage måste snabba och billiga analyser tas fram. Preliminära studier vid vår institution av presssaft från ensilage med IR-spektrofotometrisk metod har visat på goda möjligheter för denna teknik. Den används idag för rutinmässig mjölkanalys av fett, protein och laktos och enbart i Sverige utförs mer än fem miljoner analyser årligen. Elektromagnetiska spektra från det centrala infraröda våglängdsområdet 3000-10000 nm (MIR) är synnerligen specifika och kan användas som "fingeravtryck" för olika organiska föreningar. Detta beror på att de ingående funktionella grupperna absorberar strålning i specifika våglängdsområden. I det nära infraröda (NIR) området finns inga direkta samband mellan absorption och funktionella grupperna. Snabbanalyser för fasta produkter har ändå utvecklats inom NIR-spektroskopin. Nackdelen med NIR-analysen är att den behöver ständig kalibrering och dessutom är analysnoggrannheten oftast otillfredsställande. Instrumenten är dyra (>1,000,000 kr) och är därför endast aktuella på stora centrallaboratorier. Avancerade MIR-instrument är också relativt dyra, men till skillnad från NIR finns sedan ett par år små billiga (ca. 60,000 kr) MIR-instrument på marknaden (MIRIS AB). Det är sannolikt att denna typ av instrument kan anpassas för rådgivningsändamål för analys av ensilageextrakt direkt på gården.

För att studera mikrobproteinsyntesen behövs tillförlitliga och snabba analysmetoder som mäter mängden bildat mikrobprotein. En vanlig markör är de kvävebaser (puriner och pyrimidiner) som finns i mikrobernas RNA och DNA. Även i urin används kvävebaser som markör för mikrobproteinsyntes. Om MID-IR-tekniken kan användas blir analyser av dessa ämnen avsevärt billigare.

## **Material och metoder**

### *Skörd och ensilering*

För att få önskad spridning i ensilagetyper användes fem distinkta behandlingar på fyra olika grönmassor, alltså totalt 20 olika ensilage (Tabell 1). Grönmassan kom dels från en vall med engelskt rajgräs, dels från ett renbestånd av rödklöver som båda skördades två gånger. Vallarna slogs med slåtterkross 9 juni och 28 juli. Grönmassa togs sedan från strängen direkt eller efter upp till 10 timmars förtorkning beroende på avsedd ensilerings-ts. Vid behov torkades grönmassan sedan ytterligare med kallluft för att nå ts 33% respektive 45%. Grönmassan snittades till ca 5 cm längd. Efter att prov för senare analys frysts in blandades grönmassan om på en presenning och eventuella tillsatsmedel sprayades på. Därefter fylldes 11-16 kg grönmassa i silor av rostfritt stål med 25 liters volym och packades med hydraulisk

press. Silorna förseglades och deras vattenlås fylldes. På de silor där ett "luftskadat" ensilage skulle produceras lämnades vattenlåset öppet de tre första dygnen. Efter förseglingen kontrollvägdes silorna och lagrades i rumstemperatur i minst tre månader (106 – 169 dagar). Vattenlåsen kontrollerades regelbundet.

*Tabell 1. De fem olika ensileringsbehandlingar som användes i studien*

Typ	Avsedd ts	Tillsats o behandling
Direktskördat, restriktiv fermentation	20%	8 l myrsyra/ton
Direktskördat, kraftig fermentation	20%	Lactisil 200, 4 l/ton
Direktskördat, "luftskadat"	20%	Öppet vattenlås 3 första dygnen
Förtorkning och tillsats	33%	3 l Proens/ton
Starkt förtorkning	45%	-

#### *Preparering och våtkemisk analys*

Vid siloöppningen vägdes silorna varefter eventuellt pressvatten tappades av genom bottenpluggen. Ensilaget blandades och ca 200 g prov vägdes in i taravägda skålar och frystorkades. Vätskeprov för analys, fortsättningsvis kallat pressaft, pressades med hydraulisk press i samband med siloöppningen. Proven med avsedd ts 45% spädades först med destillerat vatten och bearbetades med Stomacher innan pressning. Alla vätskeprov centrifugerades i 10 min vid  $2500 \times g$  och filterades genom kaffefilter. Sedan vägdes 30-60 gram in i taravägd glasbägare för frystorkning och resterande mängd frystes in i provrör för vätskeanalyser. Den grönmassa som frysts in vid skörden maldes i otinat skick på köttkvarn och preparerades på samma sätt som ensilaget. Vätskeprov pressades från den malda och tinade grönmassan.

Pressaftan analyserades för Kjeldahlkväve, för fermentationsprodukter på HPLC (Andersson & Hedlund, 1983) samt för ammoniak och  $\alpha$ -aminokväve på en Technicon AutoAnalyzer (Broderick & Kang, 1980). pH mättes i samband med MID-IR-analys. Frystorkad grönmassa, helensilage och vätskeprov vägdes omgående efter frystorkningen för att få en ts-bestämning. Grönmassa och helensilage maldes sedan genom 1,0 mm såll på en hammarkvarn och analyserades för NDF i värmeskåp (Chai & Udén, 1998), buffertlösligt kväve (NorFor, 2006), ts vid 103 °C och aska. Kjeldahlkväve analyserades i duplikat direkt på otorkad grönmassa och ensilage. Det frystorkade pressaftprovet löstes upp med avjonat vatten för att ge en lösning med 10% ts som gjorde det möjligt att väga ut en känd mängd torrs substans. Under omrörning vägdes prov sedan ut för ts vid 103 °C och aska och för bestämning av lättlösliga kolhydrater (Larsson & Bengtsson, 1983) respektive neutralsocker (Theander m. fl., 1995).

#### *Beräkningar*

Redovisad torrs substanshalt är beräknad som restvikt omedelbart efter frystorkning. Kemisk sammansättning anges i gram per kg torrs substans från frystorkning. Ämnen analyserade i vätskeextrakt räknades om till innehåll i hel grönmassa/ensilage genom att anta att kvoten analyt:vatten var densamma i vätskeextraktet som i det intakta ensilaget.

Lättlösliga kolhydrater är summan av glukos, fruktos, sukros och fruktaner från den fraktionsvisa bestämningen av dessa sockerarter i vätskeextraktet. Neutralsocker är summan av rhamnos, fukos, arabinos, xylos, mannos och galaktos. Det värde för totala glukosenheter som också erhöles vid neutralsockeranalysen användes enbart för att verifiera den enzymatiska analysen. Råprotein är på konventionellt sätt beräknat som  $6,25 \times$  Kjeldahl-N. Vid summering av analyserade fraktioner har sedan korrektion för ammoniakinnehåll gjorts.

### *MID-IR spektroskopi*

Vid Kungsängens forskningscentrum finns ett MID-IR-instrument för mjölkanalys (Foss Milkoscan FT 120). I originalutförande krävs relativt stora provmängder (ca 27 ml) för att skanna och spara fullständiga spektra, då detta bara är avsett att göras vid kalibrering. Instrumentet konverterades därför så att provmängder ner till 5 ml kunde användas. Det var en förutsättning för att kunna utnyttja de äldre lagrade prover där våtkemisk analys finns sedan tidigare.

Initiala tester med instrumentet hade tidigare gjorts med prover justerade till pH 7. Såväl ammoniak som ensilageets syror befinner sig då långt från sina pKa-värden och analysen riskerar inte att störas av att de uppträder både i bas- och syraform. Med de prover som framställts för detta projekt uppträdde ibland utfällningar sedan pH justerats till 7. Centrifugering av prov och analys av pellet och supernatant tydde på att 1-5% av provets kväveinnehåll fanns i pelleten. Justering till pH 2 gav inte fällningar men tolkningen av spektra var ändå inte tillfredställande vid detta pH. Den metodik som slutligen har valts innebär justering till pH 7 med NaOH-lösning (5 M för grovjustering, 1 M för slutjustering) och därefter centrifugering vid  $2000 \times g$  i 10 min innan skanning på IR-instrumentet.

Vid skanningen gjordes två avläsningar omedelbart efter varandra med samma prov i kyvetten. Det gör att eventuella störningar från luft rörelser visar sig som bristande överensstämmelse mellan avläsningarna. Data togs ut från instrumentet som fullständiga transmittansspektra och konverterades till absorbanser efter beräkning av transmittansmedelvärdet för de båda avläsningarna. För konverteringen och för att samtidigt infoga våtkemiska analysresultat och övriga provdata skapades en VBA-applikation i MS Excel, så att en enhetlig databas kunde byggas upp.

Skanning av spektra gjordes på de särskilda försöksensilage som framställts för detta projekt och på 500 fryslagrade pressaftprover från tidigare försök, där våtkemiska analyser fanns. Skanning gjordes också på vattenlösningar av kvävebaser och på urinprover med och utan tillsats av kvävebaser och andra ämnen av analytiskt intresse (urea, kreatinin, laktos). Urinproverna justerades till pH 2 före skanning. Spektra analyserades sedan med hjälp av Procedure PLS (Partial Least Square) i SAS Version 9.1 med upp till 5 signifikanta faktorer. Instrumentets spektra innehåller värden för 1060 våglängdsband i området 2.0 – 10.8  $\mu\text{m}$ . Endast värden från våglängdsområdet 6.3 – 10  $\mu\text{m}$  användes och i många fall slogs resultat från flera närliggande våglängder samman för att minska inflytandet av små förskjutningar i toppar. För de flesta analysparametrar användes slutligen 38 sammansatta våglängder som variabler. För WSC användes 153 våglängder.

## **Resultat**

### *Ensileringsresultat*

I Tabell 2 och Tabell 3 finns analysresultat för ensilage respektive för den vätska (pressaft) som extraherats ur ensilagen med hydraulisk press. Vid skördetillfällena skilde torrsbstanshalten stort mellan rödklöver- och gräsvallarna, varför de direktskördade ensilagen av rödklöver fick en mycket lägre torrsbstanshalt än motsvarande gräsenilage. Fritt pressvatten (300-1300 gram) fanns vid tömningen bara i de direktskördade rödklöverensilagen. Viktförlusten under ensileringen var i medeltal 2,7% av torrsbstansen (0,0-8,2%) och var starkt korrelerad till mängden ättiksyra och etanol som bildats ( $r = 0,94$ ). pH-värden  $> 5$  fanns i tre ensilage. Dels i förtorkad förstaskörd av gräs, där också stor etanolproduktion skett, dels i två av rödklöverensilagen från andraskörden. De två rödklöverensilagen kännetecknades också av stor andel ättiksyra och etanol.

Tabell 2. Torrsubstans, pH och torrsubstansens sammansättning (g/kg ts) för grönmassor och ensilage

Material	Ts	pH	Aska	NDF	Rp	Lättlösl. kolh <sup>a</sup>	Neutr. kolh <sup>a</sup>	Myr-syra <sup>b</sup>	Mjök-syra	Ättik-syra	Prop.-syra	Smör-syra	Succ <sup>b</sup>	Etanol	2,3 But.-diol	Summa <sup>c</sup>
<i>Gräs skörd 1</i>																
Grönmassa	23,7%	5,80	72	454	155	141	14		1	0	0	0	0	0	0	837
Myrsyratillsats	23,8%	3,76	74	462	153	125	27	34	14	6	0	1	0	6	0	899
Lactisiltillsats	23,5%	3,64	77	460	156	31	7		118	6	0	0	0	10	0	859
Luftskadat	22,4%	3,95	79	478	164	8	19		96	11	0	8	8	17	11	886
Proenstillsats	34,8%	3,99	73	454	155	92	13	5	42	4	3	0	3	6	2	843
Förtorkning	47,3%	5,50	82	518	174	23	7		11	2	0	0	4	58	0	876
<i>Rödklöver skörd 1</i>																
Grönmassa	13,5%	5,92	91	200	209	201	21		2	1	0	0	0	2	0	725
Myrsyratillsats	14,5%	3,79	92	246	198	125	18	55	3	2	0	0	0	1	0	740
Lactisiltillsats	14,4%	3,83	93	205	185	11	8		158	16	0	0	0	5	0	676
Luftskadat	12,7%	4,06	103	230	217	3	7		191	37	0	1	6	6	4	788
Proenstillsats	35,5%	4,25	100	221	202	77	19	5	73	8	4	0	5	2	4	711
Förtorkning	47,3%	4,59	102	217	205	82	18		55	8	0	0	5	4	5	694
<i>Gräs skörd 2</i>																
Grönmassa	31,1%	5,68	94	508	92	143	14		0	0	0	0	0	0	0	853
Myrsyratillsats	29,8%	4,06	90	467	91	131	20	27	14	2	0	0	3	2	0	845
Lactisiltillsats	29,0%	3,88	90	498	94	79	10		71	8	0	1	4	9	0	858
Luftskadat	29,1%	3,98	93	487	96	68	19		65	10	0	1	4	13	0	849
Proenstillsats	35,0%	4,12	111	480	114	51	25	5	54	8	2	0	4	4	0	849
Förtorkning	42,0%	4,29	107	534	115	17	30		51	12	0	1	4	7	0	872
<i>Rödklöver skörd 2</i>																
Grönmassa	14,5%	5,82	105	284	217	100	20		1	2	0	0	0	2	0	728
Myrsyratillsats	14,7%	3,96	112	318	212	14	16	55	47	17	0	0	0	6	0	792
Lactisiltillsats	13,2%	5,20	125	327	246	3	2		33	78	7	4	10	28	0	845
Luftskadat	12,9%	5,21	126	324	243	2	2		32	79	7	7	11	28	0	840
Proenstillsats	35,0%	4,45	113	311	214	4	6	5	96	31	3	0	4	3	3	778
Förtorkning	57,9%	4,94	111	325	208	15	19		41	14	0	0	3	2	1	730

a) Lättlösl. kolh = enzymatiskt bestämda socker (glukos, fruktos, sukros, fruktaner); Neutr. kolh = (rhamnos, fukos, arabinos, xylos, mannos och galaktos)

b) Myrsyra ej analyserad, tillsatt mängd angiven; Succ = bärnstenssyra

c) Summa korrigerad för NH<sub>3</sub>

Tabell 3. Pressaftens sammansättning (g/kg torrsbstans pressaft) i grönmassor och ensilage

Material	Ts i pressaft	Aska	Rp	Mjolk- syra	Övr. ferm.	Fri glukos	Fri fruktos	Suk- ros <sup>a</sup>	Frukta- ner <sup>a</sup>	Rham- nos	Fukos	Arab.	Xylos	Mann.	Galakt.	Summa <sup>b</sup>
<i>Gräs skörd 1</i>																
Grönmassa	10,7%	178	136	1	1	166	119	30	52	2	0	5	1	16	13	717
Myrsyratillsats	11,3%	147	227	35	114	115	120	54	15	1	0	4	3	45	10	886
Lactisiltillsats	11,2%	143	294	288	38	7	36	23	10	1	0	3	2	5	6	843
Luftskadat	10,2%	163	326	246	140	-1	4	11	6	1	0	2	3	39	3	912
Proenstillsats	17,9%	144	271	102	48	99	121	10	-4	1	0	2	2	17	9	809
Förtorkning	8,4%	191	382	38	216	25	33	23	-4	1	1	3	3	9	7	916
<i>Rödklöver skörd 1</i>																
Grönmassa	10,4%	142	181	2	4	168	88	20	-3	1	0	4	6	8	10	629
Myrsyratillsats	7,5%	155	152	7	123	167	84	10	2	2	0	9	5	8	15	733
Lactisiltillsats	7,1%	143	241	348	45	1	0	34	-10	1	0	5	2	2	8	808
Luftskadat	6,8%	167	264	382	108	-4	0	12	-1	2	0	3	1	4	4	909
Proenstillsats	22,7%	147	195	136	43	111	36	-9	6	1	0	6	3	10	14	693
Förtorkning	12,7%	171	199	117	45	113	37	26	-2	1	0	8	4	8	17	732
<i>Gräs skörd 2</i>																
Grönmassa	11,2%	155	72	1	1	53	64	66	328	1	0	5	1	32	11	792
Myrsyratillsats	12,5%	138	149	42	101	61	188	29	109	1	0	8	8	31	11	873
Lactisiltillsats	11,8%	150	199	216	63	9	55	27	150	1	0	4	5	18	2	885
Luftskadat	11,9%	151	203	200	83	5	47	30	125	0	0	4	6	44	3	885
Proenstillsats	14,5%	232	206	172	58	24	104	6	28	1	0	7	8	53	11	894
Förtorkning	6,9%	202	224	181	86	10	50	-34	34	1	0	4	4	93	5	839
<i>Rödklöver skörd 2</i>																
Grönmassa	9,3%	208	144	1	6	87	35	28	14	2	1	7	6	5	12	552
Myrsyratillsats	5,8%	229	177	130	217	20	3	18	-3	2	0	9	4	23	8	825
Lactisiltillsats	4,9%	266	321	98	373	0	-2	18	-7	2	0	2	1	0	2	1019
Luftskadat	5,0%	258	300	90	370	0	-3	14	-5	1	0	2	0	0	2	973
Proenstillsats	16,1%	247	190	270	124	0	0	26	-13	2	0	5	2	3	6	831
Förtorkning	11,1%	231	180	128	64	45	6	-15	12	2	0	13	3	24	17	686

a) Negativa värden för sukros och fruktaner beror på differensberäkning vid den stegvisa analysen (Larsson & Bengtsson, 1983)

b) Summa korrigerad för NH<sub>3</sub>

### Kemisk sammansättning

I grönmassan hade rödklöver jämfört med gräs lägre halt av NDF och högre halt av råprotein och aska. Halten av lättlösliga kolhydrater var mycket hög i förstaskörden av rödklöver, men stämde väl överens med total glukos från neutralsockeranalys (ej i tabell). I rödklöver och förstaskörden av gräs dominerade fri glukos, medan det mesta sockret fanns i form av fruktaner i andraskörden av gräs.

Förändringarna under ensileringen innebar generellt en viss koncentring av aska och NDF när mer lättillgängliga delar omsattes. Också råproteinhalten ökade i en del fall. Med myrsyratillsats begränsades fermentationen starkt, utom för andraskörden av rödklöver där det mesta av sockret omsatts och mjölksyra bildats. Mängden neutralsocker var som högst 30 g/kg ts med mannos som största komponent. Ensileringen innebar oftast en ökning av andelen lösligt kväve i form av fria aminosyror och ammoniak (Diagram 1). Andelen buffertlösligt kväve (BSN) analyserad i torkat prov var väl korrelerad ( $r = 0,90$ ) med andelen lösligt kväve analyserad i vätskeextrakt. Andel BSN var också starkt korrelerad till andel fria aminosyror ( $r=0,92$ ) men sämre korrelerad till andel ammoniak ( $r=0,36$ ).

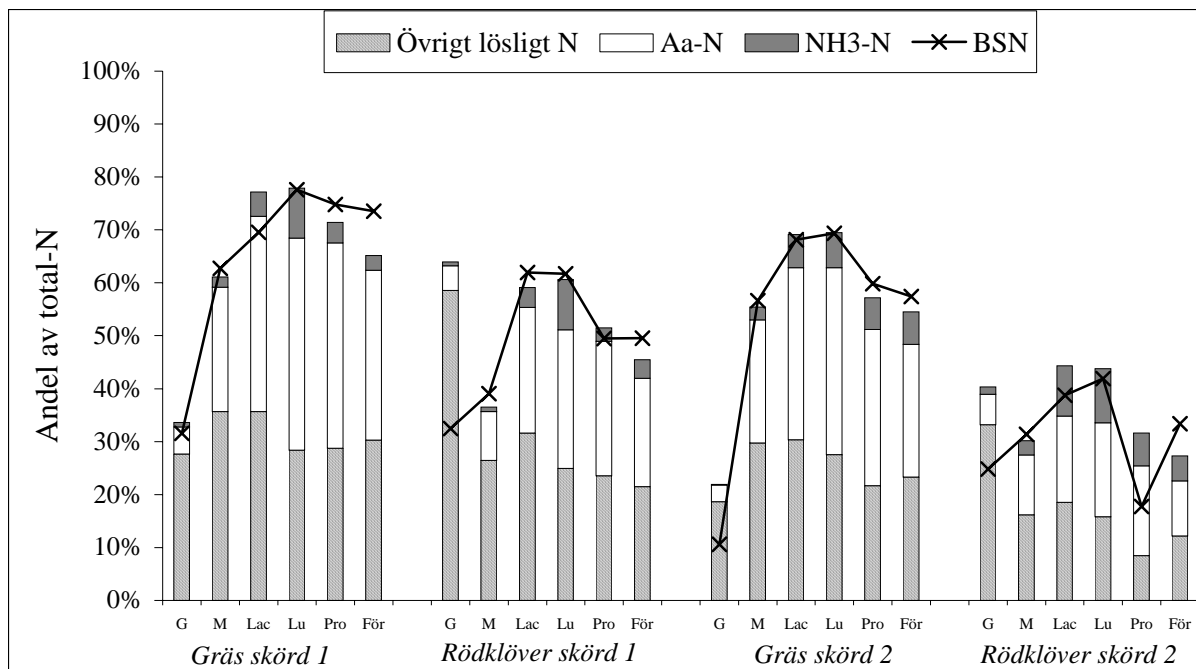


Diagram 1. Kvävefraktioner i extrakt (= "lösligt N") pressat ur grönmassor och ensilage. Här angivet som andel av totalkväve i otorkad grönmassa/ensilage. Övrigt lösligt N är Kjeldahl-N i extrakt - ( $\alpha$ -amino-N +  $\text{NH}_3$ -N). BSN är buffertlösligt N (NorFor, 2006) analyserat i torkat helensilage. G = Grönmassa, M = Myrsyrabeh.; Lac = Lactisil; Lu = Luftskadat; Pro = Proens; För = stark förtorkning

Pressaftens torrsubstans (frystorkning) varierade från 4,9-22,7% och var korrelerad till helensilagens torrsubstanshalt ( $r=0,87$ ), om de vattenspadda proverna undantogs. Torkning av pressaftens torrsubstans vid 103 °C gav torrsubstanshalter från 5,0-11,2% och saknade korrelation med resultatet från frystorkning. Ökad halt av lättlösliga kolhydrater innebar att mer av pressaftens torrsubstans torkades bort vid 103 °C ( $p=0,02$ ). Resultatet från torkning av helensilage vid 103 °C var mycket starkt korrelerat med värdet från frystorkning ( $T_{s103}$  i % = 0,95 frystorknings-ts - 0,6;  $R^2 = 1,00$ ). Andelen torrsubstans som torkades bort påverkades av laktathalt ( $p=0,002$ ) och sukroshalt ( $p<0,05$ ).

Av torrsubstansen i pressaften kunde 848 g/kg förklaras med de gjorda analyserna och av helensilagets torrsubstans förklarades 811g/kg. Den förklarade delen i ensilagets pressaft var positivt korrelerad ( $p < 0,05$ ) med ensileringsförlust, ammoniak, ättiksyra, succinat, etanol och butyrat. Den var negativt korrelerad med glukos, arabinos, xylos och galaktos. Förklarad del i helensilage var positivt korrelerad ( $p < 0,05$ ) till NDF, lösligt N och etanol. Den var negativt korrelerad med rhamnos, arabinos och galaktos.

#### MID-IR-spektroskopi

I Tabell 4 finns kalibreringsresultat för de 500 pressaftproven från tidigare ensileringsförsök och i Diagram 2 visas dessa resultat för laktat och butyrat som exempel. Prediktionens standardavvikelse, uttryckt som Root Mean Square Error, var för alla komponenter utom WSC mindre än 1 g/l. Skilda koncentrationer av olika komponenter gjorde att det relativa felet (variationskoefficienten) blev olika stort trots samma RMSE.

Tabell 4. Sammansättning och kalibreringsresultat med MID-IR-spektroskopi för 500 pressaftprover från ensileringsförsök. Värden för  $R^2$ , RMSE (Root Mean Square Error) och variationskoefficient då IR-instrumentets prediktion jämförs med våtkemiskt analysvärde

Komponent	Antal	Medel g/l	Max g/l	Min g/l	$R^2$	RMSE	Variationskoeff. (RMSE/medelv)
Acetat	489	1,46	10,70	0,17	0,91	0,39	0,27
Butyrat	149	2,10	12,70	0,02	0,92	0,79	0,38
Tot. VFA	489	2,22	25,83	0,17	0,94	0,81	0,36
Laktat	494	6,06	38,57	0,13	0,98	0,81	0,13
Succinat	498	2,03	6,64	0,16	0,83	0,47	0,23
2,3 butandiol	425	2,35	9,36	0,09	0,84	0,85	0,36
Etanol	500	3,78	18,52	0,13	0,93	0,83	0,22
WSC	246	15,36	78,49	0,00	0,94	3,90	0,25
NH <sub>3</sub>	49	0,47	1,44	0,10	0,81	0,12	0,26

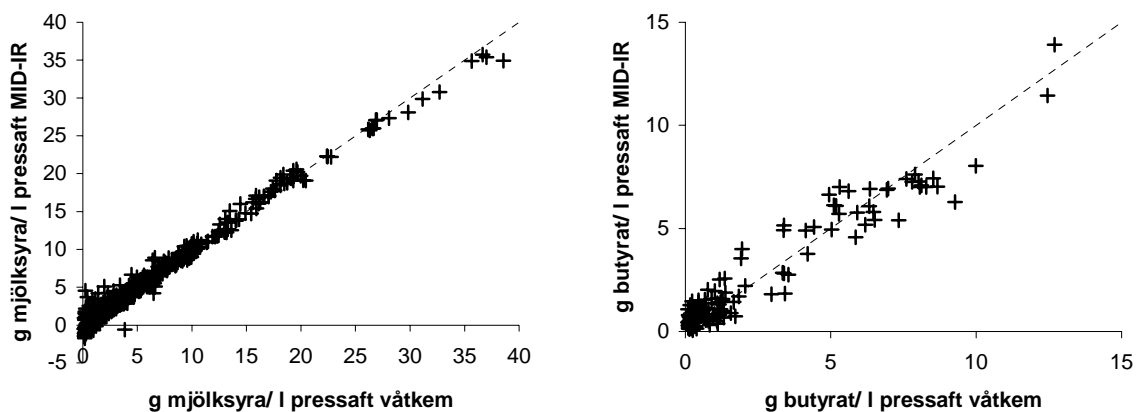


Diagram 2. Mjölksyra och butyrat i pressaft bestämda med MID-IR respektive våtkemiskt. Streckad linje är  $Y=X$ .

Med enskilda kvävebaser i de koncentrationer som normalt uppträder i våmmen (ca 0,3-0,5 g/l) var kalibreringsresultatet otillfredställande. I urinprover med koncentration 0,9-3,9 g/l av allantoin var det däremot möjligt att skapa en kalibrering ( $N=16$ ;  $R^2 = 0,98$ ; RMSE = 0,13 g). I samma prover gav ureakoncentrationer 6-16 g/l en kalibrering med  $R^2$ -värdet 1,00 och RMSE 0,22 g/l. För kreatinin i halter 0,3-2,9 g/l blev  $R^2$  0,36 och RMSE 0,09 g/l.



## Diskussion

### *Ensilagesammansättning*

Sammansättningen hos grönmassor och ensilage visade för aska, NDF, råprotein, lättlösliga kolhydrater samt mjölksyra i stort sett förväntade skillnader. De analyserade fraktionerna förklarar tillsammans drygt 800 g/kg ts av grönmassa och helensilage. Om man till resultatet adderar schablonmässiga värden för ej analyserade fraktioner (för gräs 20 g fett och 32 g pektin; för rödklöver 25 g stärkelse, 20 g fett och 120 g pektin) blir summan ändå inte större än 913 g/kg ts (841-1010 g/kg ts). Positiv korrelation mellan förklarad andel och extensiv fermentation tyder på att de ej identifierade delarna delvis omsätts till produkter som fångas upp i de analyser som gjorts i detta försök.

Den neutralsockeranalys som gjordes bidrog bara till att förklara 2-30 g av ts. Den relativt låga andelen neutralsocker i ensilagen tyder inte på att monosackarider från nedbruten hemicellulosa förekom i någon större utsträckning. I litteraturen finns uppgifter om att upp till 50% av hemicellulosan vid ensilering kan brytas ned till monosackarider (McDonald m. fl., 1991). Om mycket hemicellulosa brutits ned men fanns kvar i ensilaget som monosackarider skulle det betyda att den inte detekterades i någon av de traditionella analysmetoderna och därmed bidrog till den oförklarade delen av ensilaget. Om hemicellulosa brutits ned borde också NDF-halten i ensilaget sjunka relativt grönmassan, vilket den inte gjorde. En större felkälla än hemicellulosa som brutits ned till monosackarider är sannolikt rena partikelförluster vid NDF-analysen. Udén (2006) fann för vallensilage NDF-värden som var 50-60 g/kg ts högre om filterpapper användes istället för glasfilterrör.

Vid ugnstorkning för ts-bestämning försvinner en större eller mindre andel flyktiga ämnen. För rutinmässigt laboratoriearbete tillämpas ofta korrektioner som antingen baseras på analyser av flyktiga ämnen eller på schablonmässiga samband (NorFor, 2006). För många ämnen förutsätts att torkförlusterna är temperaturberoende. I det aktuella försöket var det dock bara för laktat och socker som förlusterna var högre vid 103 °C än vid frystorkning. Det uteblivna sambandet mellan borttorkad mängd vid 103 °C och innehållet av framförallt etanol tyder på att förluster skett redan vid frystorkningen. Om flyktiga ämnen som analyserats i pressaft försvinner vid frystorkningen får det till följd att den oförklarade delen egentligen är större än resultaten visar.

Analysresultat från vätska måste räknas om till andel av helensilagens torrs substans. Det brukar i rutinmässigt laboratoriearbete göras under antagandet att pressaftens torrs substanshalt är försumbar. För ett ensilageprov med ts-halt 25% innebär det att en koncentration av 10 g/kg pressaft motsvarar 30 g/kg ts eftersom förhållandet vatten:ts är 75:25 i helensilaget. För många ändamål ger det tillräckligt noggrannhet, men när olika ensilage jämförs kan felet bli relativt stort. Ett mer korrekt sätt är då att som i detta försök anta att kvoten analyt:vatten är densamma i både pressaft och helensilage. Det förutsätter att bestämning av torrs substanshalt, eller snarare vattenhalt, är så korrekt som möjligt för både helensilage och pressaft. För forskningsändamål är förmodligen gaskromatografiska metoder (Porter & Baron, 1997) det lämpligaste. Vid rutinanalyser av vätskeprover med MID-IR-teknik bör det vara möjligt att samtidigt analysera vattenhalten.

Den goda korrelationen mellan andel fria aminosyror och buffertlösligt kväve, BSN, bekräftar tidigare resultat från Kungsängens forskningscentrum (Hedqvist & Udén, 2006; Slottner & Bertilsson, 2006). Det borde därför vara möjligt att få indata till NorFor-systemet för ammoniak och BSN till en relativt låg kostnad genom att använda samma våtkemiska teknik (Broderick & Kang, 1980) som i detta projekt.

### *MID-IR-spektroskopi*

Genom att i detta projekt ta fram de praktiska lösningarna och rutinerna för att preparera prover, skanna dem och behandla data har grunden lagts för ett systematiskt utvecklingsarbete av en rad tillämpningar av MID-IR-tekniken. Det arbetet fortsätter nu i flera pågående projekt.

Ett flertal av komponenterna i pressaft går att analysera med nuvarande kalibreringar, men fortfarande bör kvantitativa analyser begränsas till ämnen som förekommer i relativt höga koncentrationer, exempelvis laktat. Det fortsatta kalibreringsarbetet med pressaft kommer att inriktas på att öka noggrannheten i referensvärdena genom replikat och genom att i större utsträckning använda tillsatser av kända mängder analyt. Analys av kvävebaser direkt i de koncentrationer som förekommer i vommen visade sig inte möjligt på nuvarande stadium. Sannolikt behöver koncentrationen höjas i preparativa steg. Erfarenheter från pågående projekt där vomvätska analyseras med IR-teknik kommer att användas för att förbättra tekniken.

Möjligheterna att analysera allantoin i urin ser däremot mycket lovande ut. Koncentrationen, vanligen 1-3 g/l, är tillräckligt hög för att tillförlitligt kunna mätas direkt i urinprov. För urea, där halten i urin är 5-20 g/l, är det inte överraskande att det gick att åstadkomma en bra kalibrering. Koncentrationen i mjölk, som rutinmässigt analyseras för urea med MID-IR-teknik, är i storleksordningen 0,2-0,3 g/l. Tillämpningarna för allantoin och urea är som markörer för bildat mikroprotein respektive total kväveutsöndring i urinen. Genom stickprovtagning är det möjligt att använda metoden även i kommersiella besättningar. För att uppskatta total urinmängd används då i regel urinens innehåll av kreatinin. Tyvärr har vi ännu inte lyckats skapa någon godtagbar kalibrering för kreatinin. Det är dock troligt att det går att åstadkomma en användbar kalibrering även för kreatinin genom mätningar vid andra pH.

### **Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen**

Resultat från detta och nu pågående angränsande projekt kommer att tillsammans publiceras i en serie artiklar i internationella referegranskade tidskrifter. Genom arbetsgrupperna i NorFor sprids resultat med tillämpbarhet i den nya fodervärderingen.

### **Referenser**

- Andersson, R. & Hedlund, B. 1983. HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 176, 440-443.
- Broderick, G.A. & Kang, J.H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science* 63, 64-75.
- Chai, W. & Udén, P. 1998. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal Feed Science and Technology* 74, 281-288.
- Hedqvist, H. & Udén, P. 2006. Measurement of soluble protein degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 126, 1-21.
- Jaakkola, S. & Huhtanen, P. 1992. Rumen fermentation and microbial protein synthesis in cattle given intraruminal infusions of lactic acid with a grass silage based diet. *J. Agric. Sci.* 119:411-418.
- Larsson, K. & S. Bengtsson. 1983. Bestämning av lätt tillgängliga kolhydrater i växtmaterial. Metodbeskrivning 22. Statens Lantbrukskemiska Laboratorium, Uppsala.
- McDonald, P., Henderson, N. & Heron, S. 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2<sup>nd</sup> ed. Chalcombe Publications. p 56.
- NorFor, 2006. Metodbeskrivningar (arbetsmaterial). NorFors fodertabellgrupp
- Theander, O., Åman, P., Westerlund, E., Andersson, R. & Pettersson, D. 1995. Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin (the Uppsala method): collaborative study. *Journal of AOAC International* 78 (4) : 1030-1044.
- Porter, M. G. & Barton, D. 1997. A comparison of methods for the determination of dry matter concentration in grass silage including an extraction method for water. *Animal Feed Science and Technology* 68, 67-76.
- Slottner, D. & Bertilsson, J. 2006. Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology* 127, 101-111.
- Uden, P. 2006. Recovery of insoluble fibre fractions by filtration and centrifugation. *Animal Feed Science and Technology* 129, 316-328.