

In vitro-gasproduktion hos olika gräsarter med faeces från häst som inokulant

In vitro gas production in different grass species using equine
faecal inoculum

Stephanie Widegren



Examensarbete • 30 hp

Agronomprogrammet - husdjur
Uppsala 2020

In vitro-gasproduktion hos olika gräsarter med faeces från häst som inokulant

In vitro gas production in different grass species using equine faecal inoculum

Stephanie Widegren

Handledare: Cecilia Müller, SLU, Sveriges lantbruksuniversitet, Institution för husdjurens utfodring och vård
Examinator: Torsten Eriksson, SLU, Sveriges lantbruksuniversitet, Institution för husdjurens utfodring och vård

Omfattning: 30 hp
Nivå och fördjupning: Avancerad, A2E
Kurstitel: Självständigt arbete i husdjursvetenskap
Kursansvarig inst.: Institutionen för husdjursgenetik
Kurskod: EX0872
Program/utbildning: Agronomprogrammet - husdjur

Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2020
Omslagsbild: Jennifer Widegren
Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *in vitro*-gasproduktion, fermentation, faeces, häst, inokulat, timotej, ängssvingel, engelskt rajgräs, hundäxing, rörsvingel, foderlosta

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Sammanfattning

Hästar är grovtarmsjäsnare och basen i deras diet består av grovfoder som utgörs av gräs i ren eller blandbestånd. Gräsarternas genetiska egenskaper och reglerande mekanismer styr i interaktion med yttre faktorer arternas tillväxtmönster och näringsammansättning. Det råder idag kunskapsbrist gällande vilka gräsarter som lämpar sig för grovfoder till olika hästkategorier, och för att kunna ge tillförlitliga rekommendationer behövs mer forskning inom området. I den här studien användes ett *in vitro*-system för att mäta gasproduktionen och därmed den potentiella mikrobiella nedbrytningen av olika gräsarter hos häst. Gräsarterna som analyserades var timotej, ängssvingel, engelskt rajgräs, hundäxing, rörsvingel samt foderlosta. Gräsarterna odlades i ett randomiserat blockförsök med nio parceller per art och skördades vid tre olika skördetillfällen. Inokulatet bestod av färskt hästräck. Alla gräsprover inkuberades i duplikat. Målet var att utvärdera om gasproduktionen från olika gräsarter och skördetidpunkter skiljde sig åt. Resultatet visade att det fanns interaktionseffekter mellan skördetidpunkt och gräsart både avseende ackumulerad gasvolym och fermentationshastighet. Det fanns även skillnader mellan gräsarter samt mellan skördetidpunkter avseende fermentationshastigheten (NmL/h). I tidig skörd hade engelskt rajgräs högst ackumulerade gasvolym (NmL) ($P < 0,03$) och fermentationshastigheten (NmL/h) ($P < 0,005$) efter 6 respektive 5 h inkubation. Efter 6 h inkubation hade sent skördad hundäxing lägst ackumulerad gasvolym av alla kombinationer av gräsart och skördetidpunkt ($P < 0,04$). Utifrån den här studien drogs slutsatsen att valet av gräsart och skördetidpunkt kan ha betydelse för hur gräset fermenteras i hästens grovtarm. Vidare studier behövs för att jämföra hur väl *in vitro*-metoden reflekterar den nedbrytning som sker *in vivo*.

Nyckelord: engelskt rajgräs, fermentation, foderlosta, gasvolym, hundäxing hästräck, rörsvingel, timotej, ängssvingel

Abstract

The horse is a hindgut fermenter and the basis of its diet consists of forage composed of grass in pure or mixed stands. Different grass species have their own characteristic growth pattern and nutritional composition. The ratio of different components is reflected by interaction between external environmental factors and the grasses genetic properties and regulatory mechanisms. There is a lack of knowledge on which grass species are most suited for different types of horses, and to be able to give reliable recommendations more research is needed in this area. In this study, an *in vitro* gas system was used to measure gas production and thus the potential microbial degradation of different grass species in horses. The analysed species were, timothy, meadow fescue, perennial ryegrass, orchardgrass, tall fescue and smooth brome grass. The grasses were cultivated in a randomized block trial with nine parcels per species and with three different times of harvest. The inoculum consisted of freshly voided horse faeces. All grass samples were incubated in duplicate. The aim was to evaluate whether gas production differed between grass species and time of harvest. The result showed that there were effects of interaction between time of harvest and grass species both in terms of accumulated gas volume and fermentation rate. There were also differences between grass species and between time of harvest regarding the fermentation rate (NmL/h). In early harvest perennial ryegrass had the highest accumulated gas volume ($P < 0,03$) and fermentation rate (NmL/h) ($P < 0,005$) after 6 and 5 hours respectively. After 6 h incubation late harvested orchardgrass had the lowest accumulated gas volume of all combinations of grasses and time of harvest ($P < 0.04$). Based on this study, it was concluded that the choice of grass species and time of harvest may have a significant effect on how the grass is fermented in the horse's large intestine. How well the *in vitro* method reflects what happens *in vivo*, regarding the fermentation of different grass species, needs to be investigated further.

Keywords: fermentation, gas volym, horse faeces, meadow fescue, orchardgrass, perennial ryegrass, smooth brome grass, tall fescue, timothy

Innehållsförteckning

Förkortningar	8
1 Inledning	9
2 Litteraturgenomgång	11
2.1 Gräsets struktur	11
2.1.1 Icke-strukturella kolhydrater	11
2.1.2 Frukthan	12
2.1.3 Strukturella kolhydrater	12
2.2 Faktorer som inverkar på gräsets smältbarhet och innehåll av kolhydrater	13
2.2.1 Botaniskt utvecklingsstadium	13
2.2.2 Dygnsvariation	13
2.2.3 Miljöfaktorer	14
2.2.4 Smältbarhet för olika gräsarter	14
2.3 Hästens digestion	16
2.3.1 Munhålan	16
2.3.2 Magsäck	17
2.3.3 Tunntarm	17
2.3.4 Grovtarmen	18
2.4 Hälsoproblem kopplat till icke-strukturella kolhydrater	19
2.4.1 Fång	19
2.4.2 Insulinresistens och ekvint metabolt syndrom	19
2.4.3 Kolik	20
3 Material och metod	22
3.1 Växtmaterial och skörd	22
3.2 <i>In vitro</i> -inkubering	22
3.2.1 Inkubationsförberedelser	23

3.2.2	Inokulant och inkubering	23
3.2.3	Gas <i>in vitro</i> -teknik	24
3.3	Beräkningar och statistisk analys	25
4	Resultat	26
4.1	Total gasvolym	26
4.2	Fermentationshastighet	29
4.2.1	Skillnader mellan skördetidpunkter	32
4.2.2	Skillnader mellan gräsarter	34
4.3	Kontrollprov för låg och hög smältbarhet	34
4.4	Effekt av omgångar	35
5	Diskussion	36
5.1	Total gasproduktion	36
5.2	Fermentationshastighet	36
5.2.1	Botaniskt utvecklingsstadium	37
5.2.2	Gräsarter	38
5.3	Faktorer som påverkar gasproduktionen	38
5.4	Framtida forskning	39
5.5	Slutsats	41
	Referenslista	42
	Tack	49
	Bilaga 1	50

Förkortningar

DP	Degree of polymerisation/polymeriseringsgraden, beskriver antalet monomera enheter i makromolekylen
NDF	Neutral detergent fiber
NmL	Normalmilliliter. Normal står för standardtemperatur och standardtryck, 0°C och 1 atm
NSC	Non structural carbohydrates/Icke strukturella kolhydrater
VFA	Volatile Fatty Acids, flyktiga fettsyror

1 Inledning

Hästen är en herbivor grovtarmsjäsare vars huvudsakliga energikälla härrör från kolhydrater i grovfoder (Harris *et al.*, 2017). I stora delar av världen består grovfodret av olika gräsarter i ren- eller blandbestånd, antingen färskt, torkat eller ensilerat (Harris *et al.*, 2017). Forskning kring gräsarter och deras egenskaper har främst fokuserats på hög smältbarhet och stor andel icke- strukturella kolhydrater (non-structural carbohydrates, NSC) för att kunna möta energibehovet hos högproducerande mjölkkor (Humphreys *et al.*, 2006; Shewmaker *et al.*, 2006). Majoriteten av olika hästkategorier har jämfört med mjölkkor betydligt lägre energibehov, och gräsvallar med arter eller sorter avsedda för mjölkkor lämpar sig ofta dåligt till hästens behov. Det råder idag kunskapsbrist gällande vilka gräsarter som lämpar sig för grovfoder till hästar, och för att kunna ge tillförlitliga rekommendationer behövs mer forskning inom området.

Gräsens smältbarhet bestäms i huvudsak av andelen strukturella kolhydrater, men kan också påverkas av andelen NSC. Vid fermentation i hästens grovtarm sker en produktion av flyktiga fettsyror (VFA), gas och små mängder laktat (Harris *et al.*, 2017). Gasproduktionen reflekterar fermentationen och kan fungera som en indikator på den mikrobiella aktiviteten och digestionen av substrat i grovtarmen (Murray *et al.*, 2014; Franzan *et al.*, 2018; Garber *et al.*, 2018). En stor mängd NSC som når grovtarmen fermenteras snabbt och kan orsaka störningar i grovtarmens mikrobiota, som i sin tur kan leda till att hästen utvecklar fång eller drabbas av framför allt gaskolik (Bailey *et al.*, 2002; Bailey *et al.*, 2004; Van Eps & Pollitt, 2006).

Eftersom de traditionella *in vivo*-metoderna är dyra, tidskonsumerande och kräver fistulerade djur är det av intresse att utveckla andra metoder för att skatta fodrets fermentation i grovtarmen. En *in vitro*-teknik, där hästräck används som inokulant (istället för ingesta eller vomvätska) har potential att bidra till ökad kunskap om hästens digestion och utvärdering av olika foder för hästar (Murray *et al.*, 2014; Franzan *et al.*, 2018; Garber *et al.*, 2018).

Syftet med den här studien var att genom *in vitro*-studier mäta gasproduktionen och därmed den potentiella mikrobiella nedbrytningen av olika gräsarter hos häst. Målet var att utvärdera om gasproduktionen skiljde sig åt mellan olika gräsarter och skördetidpunkter, då detta kan ha betydelse för hur olika gräsarter värderas avseende lämplighet för användning i slåttervall för häst. Den första hypotesen var att den totala volymen producerad gas samt med vilken hastighet gasproduktion skedde skiljde sig åt mellan olika gräsarter. Den andra hypotesen var att gräs skördade i ett sent botaniskt utvecklingsstadium skulle ge långsammare gasproduktion jämfört med gräs skördade i tidigare stadium.

2 Litteraturgenomgång

2.1 Gräsets struktur

Gräset är en levande organism vars struktur och näringsmässiga sammansättning är under ständig förändring över växtsäsongen. Gräsets växtceller består av tre huvudkomponenter; cellmembran, cytoplasma och cellvägg. Cellmembranet reglerar transporten av substrat in och ut ur cellen. I cytoplasman finns cellens organeller som sköter energimetabolismen samt nybildningen av molekyler. Det är även i cytoplasman som näringsämnen likt lösliga (icke-strukturella) kolhydrater, smältbara protein och lipider lagras. Cellväggen stabiliserar växten och består av förutom vatten främst av strukturella kolhydrater (Fonnesbeck, 1968). Stjälken utgör växtens lagringsorgan och är den del av gräset som består av störst andel fibrer. I bladen sker fotosyntesen, det vill säga bildandet av energirika kolhydrater från ljusenergi och CO₂. Bladen har en högre smältbarhet och innehåller en högre andel NSC än stjälken, och gräsets näringsinnehåll styrs till stor del av förhållandet mellan stjälk och bladvävnad (Shewmaker *et al.*, 2006).

2.1.1 Icke-strukturella kolhydrater

Icke-strukturella kolhydrater (NSC) utgörs av enkla sockerarter (mono- och disackarider), stärkelse, oligosackarider (fruktaner) och lösliga fibrer (β -glukaner och pektin) (Undersander, 2013). Tempererade gräsarters NSC innefattar huvudsakligen glukos, fruktos, sukros samt fruktaner vilka gemensamt utgör gruppen lättlösliga kolhydrater (WSC) och återfinns i växtcellens cytoplasma (Hoffman, 2013). De enkla sockerföreningarna (glukos, fruktos och sukros) bildas vid växtens fotosyntes och nyttjas för plantans utveckling och tillväxt. Då produktionen av de enkla sockerföreningarna överskrider energiåtgången sker syntes från enkla socker till stärkelse eller fruktan (Hoffman, 2013). De vanligaste gräsarterna som odlas under nordiska förhållanden tillhör gruppen tempererade gräs i vilka energilagringen sker

främst i form av fruktan, medan stärkelse dominerar i tropiska gräs och baljväxter (Rasmussen *et al.*, 2011). Fotosyntesen i relation till gräsets utveckling och yttre påverkande faktorer gör att koncentrationen av NSC i växten är under ständig förändring (Longland & Byrd, 2006).

2.1.2 Fruktan

Fruktan är uppbyggt av fruktosenheter som är sammanlänkade av β -2,6- eller β -2,1-bindningar, eller en kombination av dem båda. β -2,1 länkade fruktaner benämns som inulin, β -2,6-länkade kallas levaner eller phleiner, och fruktaner med båda bindningstyperna benämns graminaner (Harlow *et al.*, 2017). Längden på fruktan-kedjorna, även kallad polymeriseringsgraden (DP), beskriver antalet monomera enheter i makromolekylen (Harlow *et al.*, 2017) och antas påverka i vilken hastighet fruktan fermenteras i hästens grovtarm. Resultat från *in vitro*-försök med hästräck som inokulant har indikerat att kortkedjiga fruktaner fermenteras snabbare än långkedjiga fruktaner (Ince *et al.*, 2013; Harlow *et al.*, 2017). Bindningstyp, DP och fruktanhalten skiljer sig mellan olika gräsarter och påverkas även bland annat av botaniskt utvecklingsstadium och omgivande faktorer (Maleux & van den Ende, 2007; Kagan *et al.*, 2011). Det finns ingen mekanism som begränsar mängden fruktan som bildas i tempererade gräsarter (Longland & Byrd, 2006) och lagringen sker både i form av kort- och långkedjiga föreningar (Maleux & van den Ende, 2007). Ackumuleringen av fruktan innebär även en förflyttning av kolhydrater från bladen till lagring i stjälken (Longland & Byrd, 2006). Höga fruktannivåer (196 g/kg ts) har vid inkubering, *in vitro* med hästräck som inokulant, resulterat i en högre fermentationshastighet samt en större total gasvolym jämfört med gräs med lägre fruktannivåer (134 g/kg ts) (Ince *et al.*, 2013). Inulin har en låg DP och återfinns bland annat i cikoriarötter och jordärtskocka från vilka fruktan är lätt att utvinna, och sådana fruktaner har därför använts som fruktankälla i studier där grovtarmsstörningar inducerats för att framkalla fång hos häst (Bailey *et al.*, 2002; Milinovich *et al.*, 2006; Van Eps & Pollitt, 2006). Det är i dagsläget oklart hur de inducerade grovtarmsstörningarna förhåller sig till spontant uppkommen fång hos hästar på bete.

2.1.3 Strukturella kolhydrater

I cellväggen återfinns cellulosa och hemicellulosa vilka kategoriseras som strukturella kolhydrater. Andelen samt dess smältbarhet är det som huvudsakligen avgör gräsets energiinnehåll (Ragnarsson & Lindberg, 2008). Cellulosa är β -1,4-länkade polymerer av glukos och kan inte brytas ned av hästens egna enzymer utan endast degraderas av grovtarmens mikroflora (McDonald, 2002). Detsamma gäller för

växtens övriga cellväggskomponenter så som hemicellulosa och pektin, men i vilken utsträckning som dessa degraderas beror främst på andelen lignifierad struktur (Coenen et al., 2006; Frate, 2010). Lignin är inte en kolhydrat men är nära associerad med de strukturella kolhydraterna (McDonald, 2002). Lignin kan inte brytas ned av hästens mikroflora och lignifieringen påverkar även de övriga cellväggskomponenterna genom kemiska bindningar med dessa, vilket minskar gräsets smältbarhet (Frame & Laidlaw, 2011).

2.2 Faktorer som inverkar på gräsets smältbarhet och innehåll av kolhydrater

2.2.1 Botaniskt utvecklingsstadium

Det botaniska utvecklingsstadiet är det som i högst grad påverkar gräsets smältbarhet (Darlington & Hershberger, 1968). Cellulosa, hemicellulosa, lignin samt cellväggsprotein ingår i begreppet neutral detergent fiber (NDF) (Undersander, 2013). Andelen NDF ökar generellt i takt med att gräset mognar samtidigt som koncentrationen av råprotein (CP) minskar. Gräs i ett senare utvecklingsstadium har, i jämförelse med ett yngre gräs, en lägre andel blad gentemot stjälk och en högre proportion av cellvägg i relation till cellinnehåll (Frame & Laidlaw, 2011). Stjälken innehåller en högre koncentration av lignin och strukturella kolhydrater än bladen som innehåller en högre andel CP. Smältbarheten av NDF i vomvätska, både med avseende på omfattning och hastighet, minskar med ökad plantmognad hos gräs (Nordheim-Viken & Volden, 2009). En högre andel NDF i kombination med lägre blad:stjälkförhållande innebär att hästen inte kan utnyttja det äldre gräset lika väl som ett yngre (Darlington & Hershberger, 1968; Martin-Rosset *et al.*, 1984; Ragnarsson & Lindberg, 2008). Hästar tenderar även att föredra ett yngre gräs med högre bladdensitet framför ett moget mer lignifierat gräs (Allen *et al.*, 2013; Longland & Byrd, 2006).

2.2.2 Dygnsvariation

Mängden WSC i tempererade gräsarter varierar över dygnet, generellt är koncentrationerna lägre på morgonen för att sedan öka över dagen och nå det högsta värdet under eftermiddagen (Longland & Byrd, 2006; Kagan *et al.*, 2011). Stegningen beror sannolikt på den högre andelen sukros på eftermiddagen då det inte verkar ske några förändringar i mängden fruktan och fruktos över dygnet (Kagan *et al.*, 2018). Förklaringen till dygnsvariationen är troligen att glukosproduktionen avtar under natten

då fotosyntesen är låg för att sedan öka igen under dygnets ljusa timmar när fotosyntesen återigen är aktiv (Kagan *et al.*, 2011). Det finns dock undantag när skillnaderna över dygnet uteblir vilket indikerar att även andra faktorer kan påverka växtens kemiska sammansättning över dygnet (Kagan *et al.*, 2011).

2.2.3 Miljöfaktorer

Miljöfaktorer så som variationer i temperatur, solinstrålning, tillgängligheten på vatten och näringsämnen kan både påverka i vilken takt gräset mognar samt dess näringsammansättning i olika mognadsfaser (Nordheim-Volden & Viken, 2009). Temperaturen påverkar andelen av olika NDF-komponenter i gräset och även mängden NSC som ackumuleras (Nordheim-Volden & Viken, 2009). Låga temperaturer (5–10°C) kan associeras med höga WSC-koncentrationer, vilket kan förklaras av att fotosyntesen fortgår trots att temperaturen underskrider tröskelvärdet för vegetativ tillväxt (Pollock *et al.*, 1983; Chatterton *et al.*, 1989). Vid höga temperaturer (15–25°C) överskrider växtens respiration fotosyntesen och NSC-halten reduceras (Chatterton *et al.*, 1989; Undersander, 2013). Odling som sker i kallare klimat medför att gräs mognar senare och lignifieras långsammare än under varma förhållanden. Vid högre temperaturer reduceras smältbarheten av gräs därför till följd av ökad andel stjälk framför blad samt den högre lignifieringsgraden (Nordheim-Volden & Viken, 2009).

Faktorer som reducerar tillväxt men inte påverkar produktionen av fotosyntat resulterar i ackumulering av förhöjda koncentrationer av NSC. Omvänt, faktorer som främjar tillväxt resulterar generellt i en reduktion av NSC-halten (Nordheim-Volden & Viken, 2009). Vid brist på tillgängligt vatten minskar plantans tillväxt och stjälkens utveckling hämmas men gräsets smältbarhet minskar inte (Nordheim-Volden & Viken, 2009). Ett begränsat vattenupptag kan även medföra att kväveupptaget från marken begränsas och resulterar i ett lågt proteininnehåll (Nordheim-Volden & Viken, 2009). Generellt innebär kvävegödsling både ökad avkastning och högre innehåll av CP samt minskad koncentration av NSC i olika gräsarter (Nordheim-Volden & Viken, 2009). Effekten av kvävegödsling på fiberandelen i gräs kan variera; både avtagande och ökad kvävegödsling har rapporterats ge minskad smältbarhet samt oförändrad smältbarhet av cellväggar (Nordheim-Volden & Viken, 2009). De motsägande resultaten är troligen en effekt av interaktioner mellan kvävegödsling och de omgivande klimatfaktorerna (Nordheim-Volden & Viken, 2009).

2.2.4 Smältbarhet för olika gräsarter

Olika gräsarter har karakteristiska tillväxtmönster, och näringsammansättningen skiljer sig åt både mellan och inom arter (Undersander, 2013; Kagan *et al.*, 2018).

Forskning kring hur hästen bryter ned olika tempererade gräsarter är begränsad. Smältbarheten för olika gräsarter och säsonger kan variera mellan 400 och 700 g per kg ts (tabell 1).

Timotej (*Phleum pratense*) och ängssvingel (*Festuca pratensis*) är två av de mest odlade gräsen i Norden (Ragnarsson & Lindberg, 2008; Särkijärvi *et al.*, 2012). Timotej har en hög smältbarhet (per kg ts) under tidig utvecklingsfas men mognar snabbt och smältbarheten reduceras kraftigt med senarelagd förstaskörd (Ragnarsson & Lindberg, 2008). Ängssvingel har en relativt hög smältbarhet (per kg ts) och har vid *in vitro*-försök med vomvätska rankats strax efter engelskt rajgräs (*Lolium perenne*) och högre än timotej avseende smältbarheten (per kg ts) hos idisslare (Thorvaldsson *et al.*, 2007).

I studier där tempererade gräsarter, odlade under samma förhållanden, jämfördes med varandra avseende torrsubstansens smältbarhet hade engelskt rajgräs högst smältbarhet i relation till övriga arter (Thorvaldsson *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2013). Engelskt rajgräs har i litteraturen beskrivits som en art med höga halter av NSC (Undersander, 2013; Jensen *et al.*, 2014) medan foderlosta (*Bromus inermis*) och timotej beskrivits som arter med lägre NSC-halt (Ragnarsson & Lindberg, 2008; Undersander, 2013).

Rörsvingel (*Festuca arundinacea*) är en nära släkting till ängssvingel och har vid tidig skörd en hög smältbarhet (per kg ts) hos idisslare. Rörsvingel har även påvisats ha bra uthållighet i vallarna och hög avkastningsförmåga, vilket gjort att den diskuterats som ett alternativ i grovfoder även till häst (Särkijärvi *et al.*, 2012).

Tabell 1. Torrsubstansens skenbara smältbarhet (g/kg ts) hos häst för olika gräsarter¹ skördade vid olika tidpunkter och under olika odlingsförutsättningar

Gräsart	Torrsubstansens skenbara smältbarhet g/kg	Referens
Timotej	569-632	Darlington <i>et al.</i> , 1968
	499	Fonnesbeck, 1968
	415	Miyaji <i>et al.</i> , 2008
	457-716	Ragnarsson <i>et al.</i> , 2008
Engelskt rajgräs	489-577	Bergero <i>et al.</i> , 2002
	535	Stevens <i>et al.</i> , 2002
Foderlosta	474-477	Fonnesbeck, 1968
	521	Harber <i>et al.</i> , 1981
	514	Cymbaluk <i>et al.</i> , 1986
	477	Cymbaluk, 1990
	440	Sponheimer <i>et al.</i> , 2003
Rörsvingel	456-458	Fonnesbeck, 1968
	415	Harber <i>et al.</i> , 1981
	596-620	Moffitt, 1987
	480	Crozier <i>et al.</i> , 1997
	583	Redmond <i>et al.</i> , 1999
Hundäxing	445-588	Särkijärvi <i>et al.</i> , 2012
	445	Fonnesbeck, 1968

¹Inga studier avseende smältbarheten för ängssvingel hos häst har påträffats.

2.3 Hästens digestion

Hästens digestionskanal är fysiologiskt anpassad att utvinna energi och näring från fiberrika föda bestående i huvudsak av strukturella kolhydrater. Tunntarmen kan endast absorbera kolhydrater i form av monosackarider och således måste mer komplexa kolhydrater brytas ner innan de kan nyttjas. Kolhydrater är sammanlänkade med α - eller β -bindningar. De förstnämnda är hydrolyserbara av hästens egna enzymer i tunntarmen, och de senare bryts ned främst genom mikrobiell fermentation i grovtarmen (Frape, 2010; Harris *et al.*, 2017).

2.3.1 Munhålan

Nedbrytningen av foder påbörjas i munhålan där hästen maler fodret för att reducera partikelstorleken, samtidigt som det sker en salivutsöndring. Mängden saliv som utsöndras är större ju högre fodrets fiberinnehåll är, eftersom det tar längre tid att

mekaniskt bearbeta sådant foder jämfört med till exempel kraftfoder med lägre fiberinnehåll (Frape, 2010). Saliven innehåller HCO_3^- och är hyperton gentemot plasma, samt har ett pH mellan 8.6–9.1 (Merritt & Julliand, 2013). Det sker ingen kemisk nedbrytning av stärkelse i munhålan då saliven endast innehåller försumbara spår av α -amylas (Merritt & Julliand, 2013). Salvins huvudsakliga funktion är att verka smörjande när fodret sväljs samt att verka som buffert i magsäcken (Merritt & Julliand, 2013).

2.3.2 Magsäck

Magsäcken utgör cirka 10 procent av digestionskanalen och består av en övre del med kutan slemhinna och en nedre körtelförsedd del (Merritt & Julliand, 2013). I den körtelförsedda delen av magsäcken sker utsöndring av främst HCl och pepsin, miljön är konstant sur med ett pH mellan 2 och 3 (Frape, 2010). I magsäckens övre del finns en aktiv bakteriekultur där antalet bakterier och dess fermentationskapacitet till stor del styrs av rådande pH, som varierar mellan 5-7. I både magsäck och tunntarm har höga koncentrationer av laktatproducerande *Lactobacillus spp.*, *Streptococci spp.* och laktatutnyttjande bakterier påträffats vilket antyder att det kan ske en mikrobiell nedbrytning av NSC, medan den cellulolytiska degradingen här är försumbar (de Fombelle *et al.*, 2003).

2.3.3 Tunntarm

I tunntarmen sker den huvudsakliga nedbrytningen av hydrolyserbara kolhydrater, protein och fett (Frape, 2010). Passagehastigheten är snabb (ca 30 cm/min) och digesta kan nå grovtarmen 30–45 min efter att ha lämnat magsäcken (Santos *et al.*, 2010). Pankreassaft som utsöndras i tunntarmens början innehåller bland annat α -amylas som hydrolyserar stärkelse och frisätter α -glukos samt oligosackarider (Merritt & Julliand, 2013). Oligosackariderna degraderas vidare till monosackarider av borstbrämsenzym som sukras och maltas för att kunna absorberas över tarmväggen (Merritt & Julliand, 2013). Utsöndringen av α -amylas är relativt låg vilket innebär att endast en begränsad mängd stärkelse kan brytas ned i tunntarmen. Vid höga givror av stärkelserikt foder kan tunntarmens nedbrytningskapacitet överskridas och resultera i att onedbruten stärkelse når grovtarmen (Geor, 2010a). Motsvarande antas ske då hästen utfodras med stora mängder fruktaner vars β -2,1 och β -2,6 bindningar inte kan brytas ned av hästens egna enzymer (Hoffman *et al.*, 2001; Ince *et al.*, 2013). Det finns indikationer på att fruktaner delvis påverkas av kemisk hydrolys eller fermentation i magsäck och eventuellt tunntarm, men majoriteten av fruktanerna antas passera vidare till grovtarmen (Coenen *et al.*, 2006; Longland & Byrd, 2006). Nedbrytning av fruktaner har studerats genom att ingesta samlats in

från magsäck och tunntarm hos häst och inkuberats *in vitro* med fruktan extraherat från timotej (Ince *et al.*, 2013). Resultatet påvisade att polymera fruktaner bröts ned parallellt med att koncentrationen av oligomerer ökade, varpå slutsatsen drogs att en begränsad andel fruktan bröts ned till enklare föreningar. Det skedde ingen minskning av det totala fruktaninnehållet med ingesta från magsäcken, medan det skedde en 30 procentig reduktion då tunntarmsingesta användes. Det skulle kunna innebära att det sker en viss nedbrytning av fruktan i tunntarmen. Inkuberingen gjordes under 16 h vilket är en betydligt längre retentionstid än digesta normalt har i tunntarmen, och det kan ha inneburit en större degradering av fruktaner i *in vitro*-studien än vad som kan ske *in vivo* (Santos *et al.*, 2010; Ince *et al.*, 2013).

2.3.4 Grovtarmen

Grovtarmen utgör över 60 procent av hästens digestionskanal och omfattar caecum samt kolons olika delar. Grovtarmens mikroorganismer kan fermentera strukturella kolhydrater till flyktiga fettsyror (VFA) vilka utgör hästens huvudsakliga energikälla (Durham, 2009). Den mikrobiella fermentationen är en relativt långsam process som kan ta runt 21 – 40 h hos en vuxen häst (Frape, 2010). Grovtarmsmikrobiotan hos en häst på en grovfoderdiet utgörs huvudsakligen av gram-negativa fibrolytiska bakterier samt en mindre andel gram-positiva sackarolytiska bakterier (Frape, 2010). Fibrolytiska bakterier fermenterar de strukturella kolhydraterna (cellulosa, hemicellulosa) till framför allt acetat, propionat och butyrat. Sackarolytiska bakterier fermenterar kolhydrater som fruktaner, pektiner och β -glukaner samt övriga NSC som passerat odegraderade till grovtarmen, till laktat och propionat (Frape, 2010). Fermentationen av kolhydrater leder förutom produktionen av VFA även till att stora mängder gas bildas (Al Jassim & Andrews, 2009) huvudsakligen i form av CO_2 och CH_4 men även H_2 (Franzan *et al.*, 2018). Ackumuleringen av fermentationsgaser speglar digestans sammansättning och fermentationshastigheten (Liu *et al.*, 2018). Fibersmältbarheten (Udén & Van Soest, 1982) och fermentationsmönstret (de Fombelle *et al.*, 2001) kan skilja sig mellan olika individer vilket kan bero på skillnader i mikrobiotans sammansättning (Murray *et al.*, 2009). Om höga nivåer av odegraderad NSC (stärkelse eller fruktan) når grovtarmen gynnas tillväxten av sackarolytiska bakterier som laktatproducerande *Streptococci* och *Lactobacilli*. Laktat förekommer vanligen i mycket låga halter men vid höga koncentrationer sänks grovtarmens pH vilket gynnar de gram-positiva bakterierna på bekostnad av de fibrolytiska bakterierna som lyserar (Milinovich *et al.*, 2006; Al Jassim & Andrews, 2009). Det lägre pH-värdet försämrar även tarmväggens skyddande barriär (Milinovich *et al.*, 2006; Al Jassim & Andrews, 2009) och de fibrolytiska bakteriernas död frisätter endotoxiner samtidigt som en del av de gram-positiva bakte-

rierna kan bilda exotoxiner (Mungall *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2004). Konsekvenserna blir att endotoxiner och exotoxiner kan nå blodomloppet genom den skadade tarmväggen vilket kan kopplas till sjukdomar som endotoxinemi och även fång (Mungall *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2004; Durham, 2009).

2.4 Hälsoproblem kopplat till icke-strukturella kolhydrater

2.4.1 Fång

Fång är en multifaktoriell sjukdom som orsakar en separation mellan hovbenet och hovväggens inre lamellager, vilket kan leda till en framåttrotation av hovbenet som skadar läderhuden samt omgivande blodkärl (Pollitt, 2004). Sjukdomen orsakar hålda, stor smärta och drabbar hästar världen över. Uppkomsten av fång varierar över säsongen och de flesta fallen inträffar under maj och juni vilket kan kopplas till ett ökat intag av tidigt betesgräs innehållande stora mängder NSC (Frank *et al.*, 2010). Det är etablerat att en överkonsumtion av stärkelse eller fruktan både vid ett enskilt tillfälle och i lägre doser över en längre period kan framkalla fång hos häst (Bailey *et al.*, 2002; Van Eps & Pollitt, 2002; Milinovich *et al.*, 2006; Burns *et al.*, 2013). Det är fortfarande inte känt varför vissa individer drabbas av fång och andra inte, trots samma tillgång på bete. Teorier som undersökts är bland annat att olika individer är olika känsliga fysiologiskt i grovtarmsområdet (Bailey *et al.*, 2004), och att grovtarmsmikrobiotan skiljer sig åt mellan olika individer (Murray *et al.*, 2009).

2.4.2 Insulinresistens och ekvint metabolt syndrom

Ekvint metabolt syndrom (EMS) är ett sjukdomskomplex som i huvudsak omfattar nedsatt insulinkänslighet, episoder av fång och generell eller regional fetma (Frank *et al.*, 2010). Insulinkänsligheten kan variera över säsongen med högre koncentrationer av insulin i blodet under sommar än vinter vilket kan kopplas till det ökade intaget av betesgräs innehållande höga koncentrationer NSC (Geor, 2010b).

Foderstater rika på NSC har visat sig både förvärra IR (Bailey *et al.*, 2007) och öka risken för att nedsatt insulinkänslighet uppstår (Hoffman *et al.*, 2003). Höga insulinkoncentrationer i plasma har påvisats kunna orsaka fångsymptom hos hästar utan tidigare fånghistorik (Asplin *et al.*, 2007).

2.4.3 Kolik

Kolik definieras som smärta från bukhålan, ofta från mag-tarmkanalen vilket innebär en fysiologisk störning av digestionskanalens funktion. Det beskrivs vanligen som ett symptom eller tillstånd snarare än en sjukdom (Archer & Proudman, 2006). Det finns ett flertal typer av kolik, till exempel förstoppnings- eller gaskolik, vilka kan vara ett förstadium till lägesförändringar av olika delar av tarmkanalens (Bentz, 2004). Gaskolik inträffar när bildningen av gas från den mikrobiella fermentationen i grovtarmen överstiger hastigheten med vilken gasen tas upp till blodet och avlägsnas från tarmen. Vid ett högt intag av snabbt fermenterbara kolhydrater kan gasproduktionen överstiga upptaget från tarmen (Cunha, 2012). Det är även känt att en överkonsumtion av stärkelse leder till en ökad mikrobiell laktatproduktion i grovtarmen vilket följs av skadligt lågt pH, vilket i sin tur kan leda till att hästen drabbas av kolik (Shirazi-Beechey, 2008).

2.5 *In vitro*-fermentation med faeces som inokulant

In vitro – gastekniken har använts för att mäta fermentationen som sker då ett substrat inkuberas tillsammans med en aktiv mikrobflora (Murray *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2009; Elghandour *et al.*, 2014). Mängden gas och i vilken hastighet den produceras reflekterar fermentation som sker och kan fungera som en indikator på den mikrobiella aktiviteten och digestionen av substrat (Murray *et al.*, 2014; Franzan *et al.*, 2018; Garber *et al.*, 2018). Det finns matematiska modeller som möjliggör matematiska bearbetningar av gaskurvorna för att identifiera hur olika fraktioner fermenteras (Groot *et al.*, 1996). Genom att använda träck som inokulant kan ett substrats nedbrytningspotential skattas utan att levande hästar behöver användas (Murray *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2014; Franzan *et al.*, 2018).

Mätning av gasproduktion *in vitro* har främst använts med vomvätska som inokulant, men i ett flertal studier har vomvätska kunnat ersättas med faeces både från idisslare (Mauricio *et al.*, 2001; Akhter *et al.*, 1999) och häst (Murray *et al.*, 2005, 2009; Abdouli & Attia, 2007; Santos *et al.*, 2012; Elghandour *et al.*, 2014; Franzan *et al.*, 2018; Garber *et al.*, 2018).

Försök med *in vitro*-teknik där träck använts som inokulant varierar i tillvägagångssätt då det i dagsläget inte finns någon standardiserad metod. Tillvägagångssätten har till exempel skilt sig åt i spädningen av träcken och i förbehandling av de foder som skall testas, vilket kan medföra att jämförelser av resultat från olika studier försvåras (Franzan *et al.*, 2018).

Målet med en *in vitro*-teknik är att den ska motsvara eller likna händelser som sker *in vivo*. Nedbrytningen av substrat *in vivo* beror dels på den fermentativa akti-

viteten samt passagen av digesta. De fibernedbrytande bakteriernas degraderingsaktivitet upprätthålls av att mikroorganismerna förses med en konstant tillförsel av substrat, vilket är en begränsande faktor i *in vitro*-teknik (Franzan *et al.*, 2018).

Digesta som når grovtarmen hos häst har till skillnad från hos idisslare genomgått kemisk och enzymatisk nedbrytning innan den huvudsakliga mikrobiella fermentationen påbörjas, vilket innebär att eventuell förbehandling av foderprover kan behöva tas i beaktande (Franzan *et al.*, 2018). För att efterlikna processen i hästens digestionskanal utförde Abdouli och Attia (2007) en enzymatisk förbehandling med pepsin följt av amylas på fiberrikt hö, korn och sojamjöl. Foderproverna inokulerades sedan med faeces. Resultatet indikerade att enzymatisk förbehandling inte var nödvändig för fiberrika substrat som hö då gasproduktionen mellan förbehandlat och ej förbehandlat foder inte skilde sig åt. Däremot kan det vara relevant med enzymatisk förbehandling om substratet innehåller hög andel protein och stärkelse som i fallen med sojamjöl och korn (Abdouli & Attia, 2007).

3 Material och metod

3.1 Växtmaterial och skörd

Timotej (*Phleum pratense* "Grindstad"), ängssvingel (*Festuca pratensis* "Minto"), engelskt rajgräs (*Lolium perenne* "Figgjo"), hundäxing (*Dactylis glomerata* "Laban"), rörsvingel (*Festuca arundinacea* "Swaj") samt foderlost (*Bromus inermis* "Leif") såddes in i försöksrutorna i ett randomiserat blockförsök med nio parceller per art. Försöksrutorna var placerade vid Vollebekk försöksgård, Ås (59°39'N), på Norges miljö- och biovetenskapliga universitet (NMBU). Rutorna anlades under våren 2018 och gödslades med 100 kg N/ha (22-3-10 (N-P-K)) vid växtstart. Prover från förstaskörd klipptes vid tre olika plantmognadsstadier under sommaren 2019; tidig (2019-06-04), medium (2019-06-17) och sen (2019-07-01). Tre parceller per art klipptes vid varje skördetillfälle. De skördade gräsen torkades till hö i värmeskåp under två dygn i 50 °C, och maldes sedan genom ett 1 mm såll. Proverna skickades till SLU, Uppsala under slutet av oktober 2019 då *in vitro*-mätningarna av gasproduktion påbörjades.

3.2 *In vitro*-inkubering

Inkuberingen genomfördes i ett *in vitro*-system med gasflödesmätare (Gas Endeavour, Bioprocess Control AB, Lund, Sverige). Systemet var försett med 15 förslutbara 500 ml Duran glasflaskor konstruerade med en extra flaskhals. Inkuberingen genomfördes i nio omgångar med 12 gräsprover per omgång. I varje omgång fanns även kontrollprov med hög (sukros) och låg smältbarhet (halm) samt en blank innehållandes endast buffert och inokulant. Totalt analyserades 108 gräsprover, 54 unika prover och således sex observationer för varje art vid en specifik skördetidpunkt. Alla gräsprover inkuberades i duplikat men inte i samma omgång. Vilka gräsprover som var med i vilken omgång var slumpmässigt.

3.2.1 Inkubationsförberedelser

Dagen före inkubation bereddes 7 L buffert med följande koncentrationer per liter: 5,80 g K_2HPO_4 , 0,50 g $(NH_4)_2HPO_4$, 1,00 g NaCl, 0,50 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,10 g $CaCl_2$ och 8,50 g $NaHCO_3$ tillsatt i avjoniserat vatten. Blandningen förvarades i 38°C vattenbad med tillförsel av CO_2 och under omrörningen över natt. Cirka 60 min före inkubation tillsattes 8,50 g $NaHCO_3$ till bufferten. På inkubationsdagen vägdes 4 g ($\pm 0,005$) av varje gräsprov, halm och sukros in i en slumpmässigt utvald flaska. Efter invägning placerades flaskorna i 38°C vattenbad (figur 1). Flaskorna var numrerade och varje flaska placerades på samma ställe i vattenbadet under alla försöksomgångar. Alla flaskor var försedda med en omrörare som roterade 40 varv per minut med intervallet 60 sekunders omrörning och 60 sekunder stilla. Omröraren bytte rotationsriktning för varje intervall.



Figur 1. Vattenbad med inkubationsflaskor, försedda med motorer och omrörare samt slangar kopplade till flödesmätare (ej i bild).

3.2.2 Inokulant och inkubering

Tolv kliniskt friska hästar uppstallade på SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper, användes som faecesdonatorer. Hästarna utfodrades med hösilage, uppblött betfibermix (ca 200 g per häst och dag), havre (ca 100 g per häst och dag) samt mineralfoder och hade *ad libitum* tillgång på vatten och saltsten samt daglig utevistelse i grushagar. Faeces från två slumpmässigt utvalda hästar samlades in direkt vid

defekering och förvarades under anaeroba förhållanden i en kylväska med två 1,5 L PET-flaskor med 37-gradigt vatten under transport från häststall till laboratorium (ca 10 minuter). Från träcken vägdes 400 g upp i en stomacherpåse, ca 200 g från varje häst, och 2 L buffert tillfördes under CO₂-gasning. Träcken behandlades därefter i en stomacher på låg hastighet i 30 sekunder för homogenisering och blandning med bufferten, och silades sedan genom ett 2 mm såll ner i en 2 L stor E-kolv. Totalt erhöles 1,6 L som användes som inokulant. E-kolven med inokulant placerades i ett 38°C vattenbad under omrörning och med konstant tillförsel av CO₂. Flaskorna med prover var under konstant CO₂-gasning medan buffert och inokulant tillfördes. 300 ml buffert tillfördes varje flaska följt av 100 ml inokulant som tillsattes med hjälp av 100 ml-plastspruta med en gummislang som förlängning av pipen. Flaskorna förslöts och gasmätningarna startades omedelbart efter inokulant tillförts. Inkuberingarna pågick i 48 h varefter de avslutades.

3.2.3 Gas *in vitro*-teknik

Gas Endeavour-apparaturen (figur 2) mätte gasflödet genom att den fermentationsgas som bildades i varje flaska passerade en flödescell. När cirka 2 mL gas hade ackumulerats i flödescellen öppnades cellen och volymen registrerades i en processor. För upprätthålla normaliserade mätvärden (0°C och 1 atm under torra förhållanden) registrerades tryck och temperatur vid varje öppning (Liu *et al.*, 2018).



Figur 2. Gas Endeavour-apparatur, inkubationsflaskorna med omrörare sammankopplade med glasflödescellerna (i förgrunden).

3.3 Beräkningar och statistisk analys

Variansanalys (tvåvägs ANOVA) genomfördes med GLM i SAS (SAS, 2018; version 9.4) med skördetillfälle och gräsart som fixa effekter. De variabler som analyserades statistiskt var ackumulerad gasvolym vid 6, 12, 18 och 24 h inkubation, samt fermentationshastigheten vid 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 15, 18, 21 och 24 h inkubation.

Statistiskt säkerställda skillnader accepterades vid $P < 0,05$. Par av medelvärden jämfördes med korrigering med Tukey-Kramer-metoden. Fermentationshastigheten som användes var den momentana och registrerade data var en linjär interpolering mellan två mätpunkter. Medelvärden för ackumulerad gasvolym och fermentationshastighet beräknades vid varje mättillfälle för varje gräsart och skördetillfälle genom att summan av alla mätvärden dividerades med det totala antalet körningar för respektive gräsart och skördetillfälle.

Effekten av omgång, oavsett kombinationer av gräsprover i de olika omgångarna, analyserades med variansanalys (envägs ANOVA) med omgång som fix faktor. Data som analyserades var ackumulerad gasvolym efter 6, 12, 18 och 24 h inkubation. Statistiskt säkerställda skillnader accepterades vid $P < 0,05$.

4 Resultat

Baserat på avläsning av gaskurvorna och värdena för gasproduktionen för ackumulerad gasvolym, fermentationshastighet för alla gräsprov och kontrollprov bedömdes gasproduktionen efter 24 h var likvärdig den efter 48 h. De tydligaste förändringarna i gasproduktionen skedde efter 3 till 9 h inkubation och ansågs vara de mest relevanta tiderna att fokusera på. Således användes gasvolymen efter 24 h som den totala vid alla uträkningar.

4.1 Total gasvolym

Det fanns interaktionseffekter ($P < 0,03$) mellan gräsart och skördetidpunkt för ackumulerad gasvolym efter 6, 18, 20 och 24 h (Tabell 2-5).

Efter 6 h inkubation hade tidigt skördat engelskt rajgräs högre ackumulerad gasvolym jämfört med tidigt skördad timotej och hundäxing ($P < 0,03$) (tabell 2). Sent skördad hundäxing hade lägre gasproduktion jämfört med engelskt rajgräs och rörsvingel oavsett skördetidpunkt ($P < 0,04$) (tabell 2).

Tabell 2. Medelvärden för ackumulerad gasvolym (NmL) efter 6 h inkubation. SEM, medelfel. P för effekt av gräsart inom skördetidpunkt och p för effekt av skördetidpunkt inom gräsart.

Gräsart	Tidig	Medium	Sen	SEM	P-värde
Engelskt rajgräs	140 ^a	134 ^a	113 ^a	6,1	1,0
Timotej	90 ^{b,c}	87 ^b	92 ^{a,b}	6,1	1,0
Foderlost	88 ^{A,b}	120 ^{B,a,c}	96 ^{A,B,a}	6,1	<0,03
Rörsvingel	120 ^{a,c}	98 ^b	116 ^a	6,1	1,00
Hundäxing	110 ^{A,a,b}	81 ^{A,B,b}	63 ^{B,b}	6,1	<0,0001
Ängssvingel	112 ^{a,b}	88 ^b	95 ^a	6,1	1,0
P-värde	<0,03	<0,04	<0,03		

^{A,B,C} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad mellan skördetidpunkter (p<0,05).

^{a,b,c,d} Olika bokstäver inom samma kolumn anger skillnad mellan gräsarter (p<0,05).

Efter 12 h inkubation hade tidigt skördat engelskt rajgräs högre ackumulerad gasvolym jämfört med tidigt skördad timotej (P<0,04). Sent skördad hundäxing hade lägre gasproduktionen jämfört med sent skördad foderlost (P<0,05) (tabell 3).

Tabell 3. Medelvärden för ackumulerad gasvolym (NmL) efter 12 h inkubation. SEM, medelfel. P för effekt av gräsart inom skördetidpunkt och p för effekt av skördetidpunkt inom gräsart.

Gräsart	Tidig	Medium	Sen	SEM	P-värde
Engelskt rajgräs	218 ^a	204	184 ^a	13,4	1,0
Timotej	148 ^b	146	173 ^{a,b}	13,4	1,0
Foderlost	155 ^{a,b}	168	199 ^a	13,4	1,0
Rörsvingel	202 ^{a,b}	147	176 ^{a,b}	13,4	1,0
Hundäxing	198 ^{A,a,b}	148 ^{A,B}	114 ^{B,b}	13,4	<0,005
Ängssvingel	198 ^{a,b}	157	155 ^{a,b}	13,4	1,0
P-värde	<0,04	1,0	<0,05		

^{A,B,C} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad mellan skördetidpunkter (p<0,05).

^{a,b,c,d} Olika bokstäver inom samma kolumn anger skillnad mellan gräsarter (p<0,05).

Efter 18 h inkubation var gasproduktionen högre för tidigt engelskt rajgräs jämfört med alla sent skördade arterna förutom foderlost och rörsvingel. Sent skördad hundäxing hade efter 18 h lägre gasproduktion jämfört med tidigt skördad engelskt rajgräs, rörsvingel, hundäxing och ängssvingel (tabell 4).

Tabell 4. Medelvärden för ackumulerad gasvolym (NmL) efter 18 h inkubation. SEM, medelfel. . P för effekt av gräsart inom skördetidpunkt och p för effekt av skördetidpunkt inom gräsart.

Gräsart	Tidig	Medium	Sen	SEM	P-värde
Engelskt rajgräs	329 ^A	302 ^{A,B}	228 ^B	18,9	<0,04
Timotej	249	222	225	18,9	1,0
Foderlosta	253	242	251	18,9	1,0
Rörsvingel	293	220	241	18,9	1,0
Hundäxing	328 ^A	249 ^{A,B}	196 ^B	18,9	<0,0005
Ängssvingel	315	246	228	18,9	1,0
P-värde	1,0	1,0	1,0		

^{A,B,C} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad mellan skördetidpunkter (p<0,05).

^{a,b,c,d} Olika bokstäver inom samma kolumn anger skillnad mellan gräsarter (p<0,05).

Efter 24 h inkubation hade tidigt skördat engelskt rajgräs högre total gasvolym jämfört med medium skördad timotej och rörsvingel (P<0,03). Sent skördad hundäxing hade lägre gasvolym jämfört med tidigt skördad engelskt rajgräs, hundäxing och ängssvingel (P<0,03) (tabell 5).

Tabell 5. Medelvärden för ackumulerad gasvolym (NmL) efter 24 h inkubation. SEM, medelfel. P för effekt av gräsart inom skördetidpunkt och p för effekt av skördetidpunkt inom gräsart.

Gräsart	Tidig	Medium	Sen	SEM	P-värde
Engelskt rajgräs	411 ^A	374 ^{A,B,a}	275 ^B	21,6	<0,003
Timotej	309	295 ^{a,b}	281	21,6	1,0
Foderlosta	330	313 ^{a,b}	319	21,6	1,0
Rörsvingel	355	263 ^b	297	21,6	1,0
Hundäxing	397 ^A	320 ^{A,B,a,b}	262 ^B	21,6	<0,004
Ängssvingel	377	310 ^{a,b}	288	21,6	1,0
P-värde	1,0	<0,05	1,0		

^{A,B,C} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad mellan skördetidpunkter (p<0,05).

^{a,b,c,d} Olika bokstäver inom samma kolumn anger skillnad mellan gräsarter (p<0,05).

4.2 Fermentationshastighet

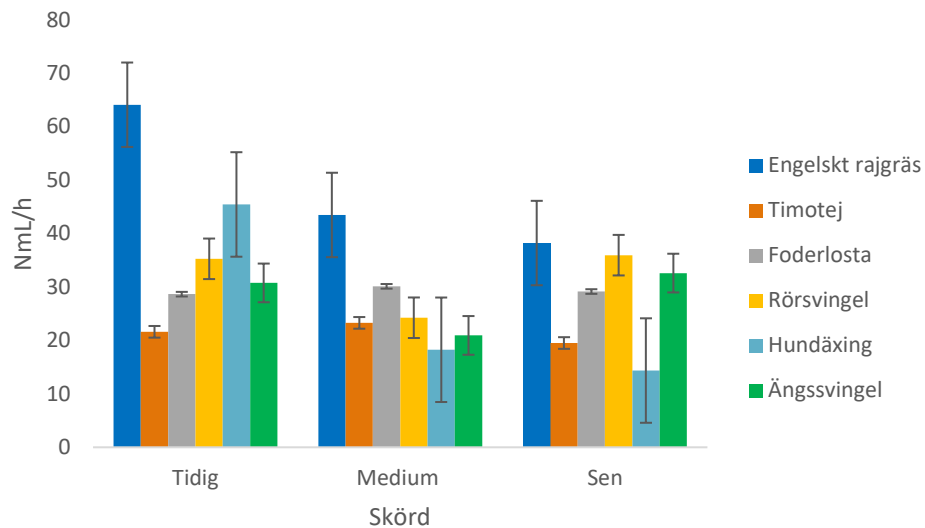
Tabell 6 visar effekt av gräsart och skördetidpunkt på den momentana fermentationshastigheten vid olika tidpunkter.

Tabell 6. Effekter för interaktion, gräsart och skördetidpunkt avseende fermentationshastigheten efter analyserade mättillfällen. *P-värden är signifikanta (<0,05).

Inkubationstid (h)	P-värde		
	Gräsart	Skördetidpunkt	Gräsart × Skördetidpunkt
2	0,8622	0,3235	0,3629
3	0,5175	0,5045	0,8110
4	0,0693	0,0020*	0,6345
5	<0,0001*	0,0001*	0,0008*
6	<0,0001*	0,0004*	<0,0001*
9	0,9504	0,0673	0,3069
12	0,0177*	<0,0001*	0,9269
15	0,0034*	<0,0001*	0,7856
18	0,0078*	<0,0001*	0,0876
21	0,0062*	0,3556	0,3466
24	0,0704	0,1035	0,3962

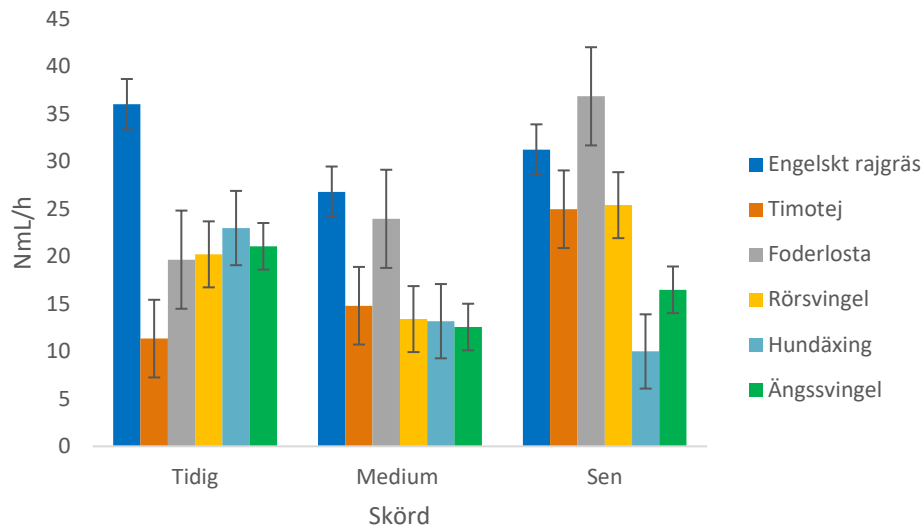
Det fanns interaktionseffekter mellan gräsart och skördetidpunkt för fermentationshastigheten (NmL/h) efter 5 och 6 h inkubation ($P < 0,0008$) (figur 3-4).

Tidigt skördat engelskt rajgräs hade efter 5 h inkubation högst fermentationshastighet (NmL/h) i jämförelse med övriga kombinationer av gräsart och skördetidpunkt ($P < 0,005$) utom för tidigt skördat hundäxing (figur 3).



Figur 3. Fermentationshastighet för inkuberade gräsarter i NmL per h efter 5 h inkubation. Tidigt skördat engelskt rajgräs hade högre fermentationshastighet (64 NmL/h) jämfört med alla andra kombinationer av art och skördetidpunkt, ($P < 0,005$). Felstaplarna visar medelfel (SEM).

Efter 6 h inkubation hade sent skördad foderlosta och tidigt skördat engelskt rajgräs högre fermentationshastighet (NmL/h) än övriga tidigt skördade arter, förutom från tidigt skördad hundäxing ($P < 0,04$) (figur 4). Sent skördad hundäxing och tidigt skördad timotej hade efter 6 h inkubation lägre ($P < 0,05$) fermentationshastighet (NmL/h) än övriga tidigt skördade arter. Övriga interaktionseffekter mellan art och skördetidpunkt för fermentationshastighet vid 5 och 6 h inkubering återges i tabell A och B, bilaga 1.



Figur 4. Fermentationshastighet för inkuberade gräsarter i NmL per h efter 6 h inkubation. Sent skördad foderlosta (37 NmL/h) och tidigt skördat engelskt rajgräs (36 NmL/h) hade högre fermentationshastighet jämfört med övriga tidigt skördade arter ($P < 0,0004$). Sent skördad hundäxing (10 NmL/h) och tidigt skördad timotej (11 NmL/h) ($P < 0,05$) hade lägre fermentationshastighet jämfört med övriga tidigt skördade arter. Felstaplarna visar medelfel (SEM).

4.2.1 Skillnader mellan skördetidpunkter

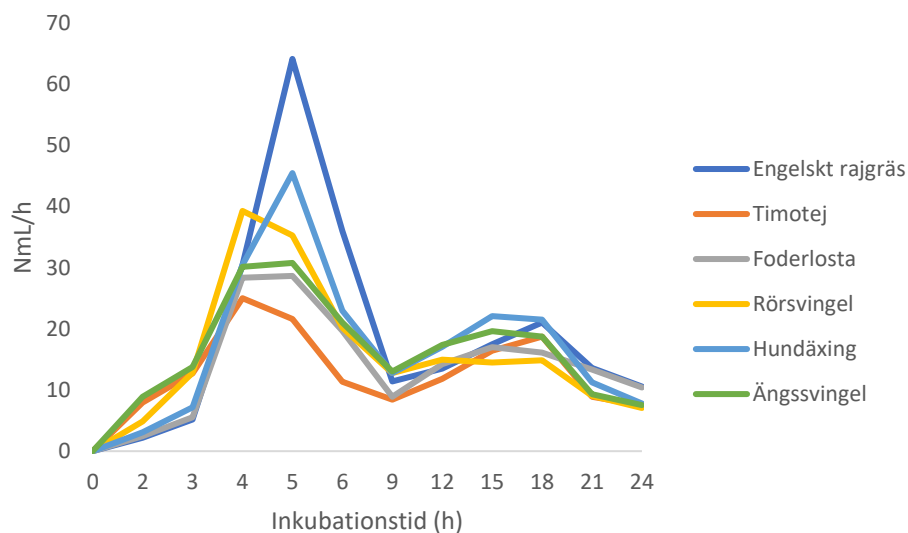
Efter 4 och 12 h inkubation var fermentationshastigheten (NmL/h) högre för tidigt och mediumskördat gräs i jämförelse med sent skördade gräs ($P < 0,03$) (tabell 7). Efter 15 h inkubation var alla skördetidpunkter skilda från varandra, fermentationshastigheten var högst för den tidiga skörden, följt av mediumskörd och sen skörd ($P < 0,03$) (tabell 7). Efter 18 h hade tidigt skördat gräs högre fermentationshastighet i jämförelse med medium och sent skördat gräs ($P < 0,0001$) (tabell 7).

Tabell 7. Skillnader mellan fermentationshastighet (NmL/h) vid olika skördetidpunkter efter 4, 12, 15 och 18 h inkubation. SEM, medelfel.

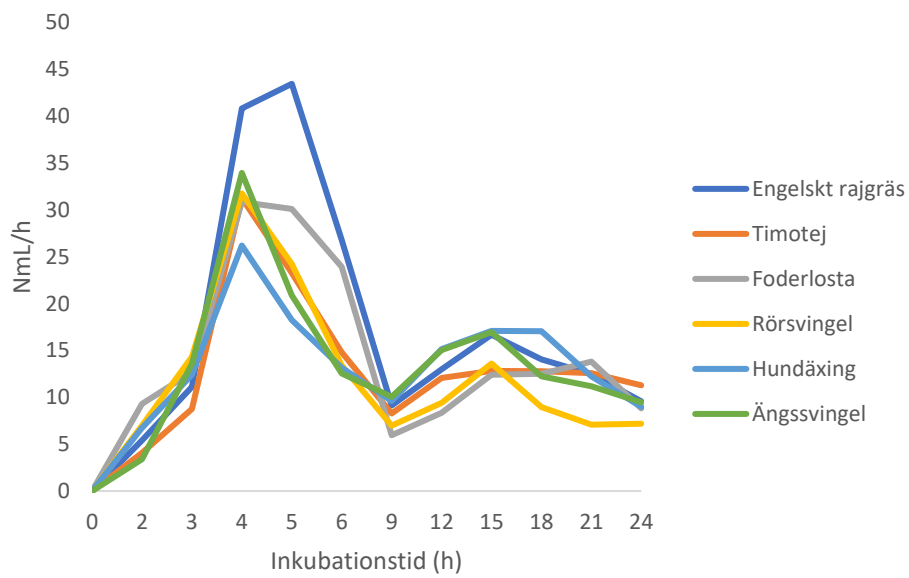
Skördetidpunkt	Inkubationstid (h)			
	4	12	15	18
Tidig	31 ^A	15 ^A	18 ^A	18 ^A
Medium	32 ^A	12 ^A	15 ^B	13 ^B
Sen	23 ^B	8 ^B	10 ^C	11 ^B
SEM	1,9	0,9	0,8	0,7
P-värde	<0,03	<0,02	<0,03	<0,0001

^{A,B,C} Värden med olika bokstäver inom samma kolumn anger skillnad mellan skördetidpunkter för givet P-värde.

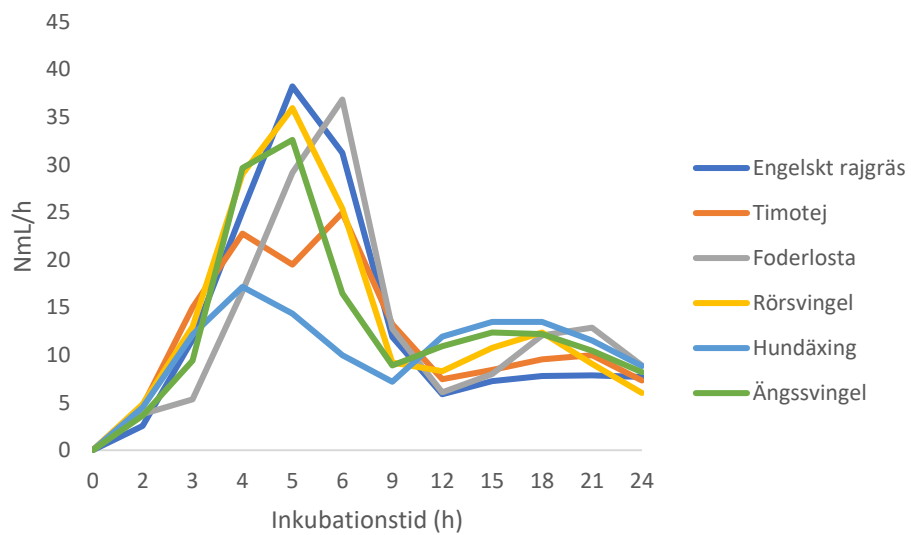
I figur 5-7 visas fermentationshastigheten över tid (24 h inkubation) för de olika gräsarterna vid tidig, medium respektive sen skörd.



Figur 5. Fermentationshastighet över 24 h för de olika gräsarterna vid tidig skörd.



Figur 6. Fermentationshastighet över 24 h för de olika gräsarterna vid mediumskörd.



Figur 7. Fermentationshastighet över 24 h för de olika gräsarterna vid sen skörd.

4.2.2 Skillnader mellan gräsarter

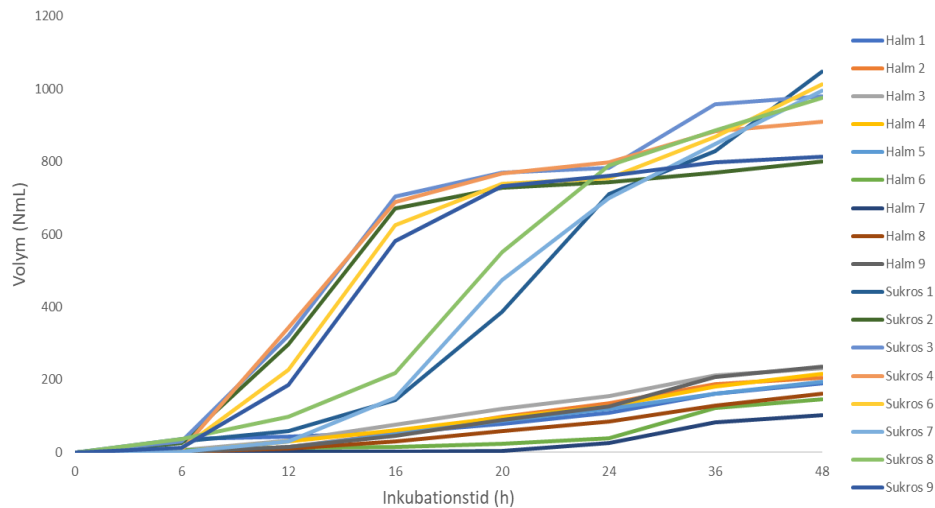
Efter 15 h var fermentationshastigheten högre för hundäxing i jämförelse med timotej, foderlost och rörsvingel. Efter 21 h hade rörsvingel den lägsta fermentationshastigheten av alla de observerade arterna (tabell 8).

Tabell 8. Skillnader mellan fermentationshastighet för olika gräsarter vid 12, 15, 18 och 21 h inkubation.

Gräsart	Inkubationstid (h)			
	12	15	18	21
Engelskt rajgräs	11	14 ^{A,B}	14 ^{A,B}	11 ^A
Timotej	10	13 ^B	14 ^{A,B}	10 ^A
Foderlost	10	12 ^B	14 ^{A,B}	13 ^A
Rörsvingel	11	13 ^B	12 ^B	8 ^B
Hundäxing	15	18 ^A	17 ^A	12 ^A
Ängssvingel	14	16 ^{A,B}	14 ^{A,B}	10 ^A
SEM	1,3	1,1	0,9	0,9
P-värde	>0,06	<0,05	<0,03	<0,0001

4.3 Kontrollprov för låg och hög smältbarhet

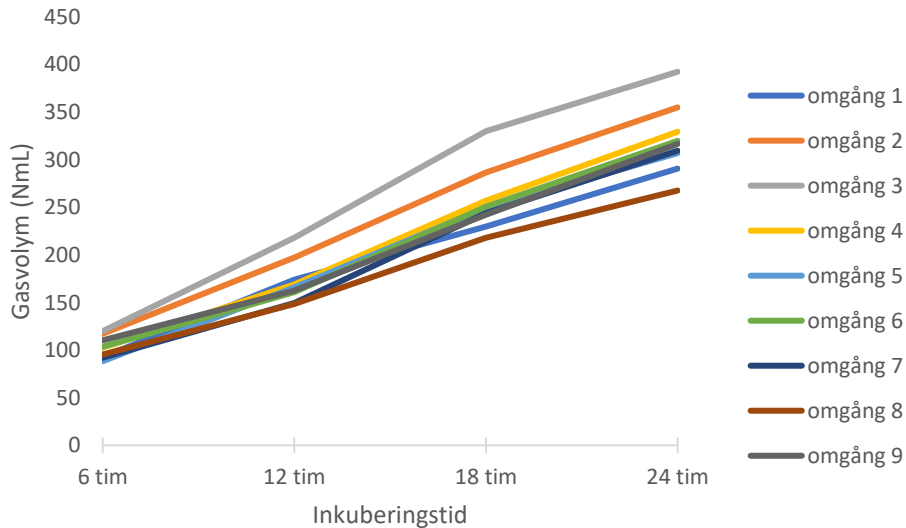
Vid sex av nio omgångar gav de blanka proverna ingen gasproduktion, vid de tre resterande omgångarna var den ackumulerade gasvolymen <28,9 NmL vilket tolkades som försumbara volymer och som inte togs hänsyn till i vidare beräkningar. Den totala gasvolymen producerad från kontrollproverna med hög (sukros) respektive låg smältbarhet (halm) redovisas i figur 8. Sukrosprovet från omgång sex utgick på grund av brist på inokulant. Den totala gasvolymen efter 48 h inkubation av sukros varierade mellan 801–1048 NmL vilket var den högsta producerade gasvolymen. Mätbar fermentationshastighet (>10,0 NmL/h) från sukrosproverna inträffade först efter 6 h. Halmproverna nådde en total ackumulerad gasvolym som varierade mellan 101–236 efter 48 h, vilket var lägst av alla inkuberade substrat. Kontrollproverna gav gasprofiler som visuellt överensstämde med varandra och försöket bedömdes som upprepningsbart.



Figur 8. Ackumulerad gasvolym (NmL) från prov med hög (sukros) respektive låg smältbarhet (halm) under 48 h inkubation med faeces från häst som inokulant, gasvolymen uppmätt i nio omgångar.

4.4 Effekt av omgångar

Ingen skillnad i ackumulerad gasvolym (NmL) fanns vid jämförelse mellan de nio försöksomgångarna (figur 9) sett till de olika gräsproverna, kontrollproverna ingick inte i jämförelsen.



Figur 9. Medelvärden för den ackumulerade gasvolymen (mL) för de nio inkuberingsomgångarna vid 6, 12, 18 och 24 h inkubation. Det fanns ingen skillnad i gasvolym mellan omgångarna ($P > 0,2$).

5 Diskussion

5.1 Total gasproduktion

I här studien ingick inga analyser av gräsarternas kemiska sammansättning. Således är teorierna om gräsens olika beståndsdelar och dess koncentrationer antagande som gjorts utifrån ackumulerad gasproduktion och fermentationshastighet från de olika gräsarterna.

Tidigt skördat engelskt rajgräs hade efter 6 h inkubation en högre ackumulerad gasproduktion än majoriteten av gräsarterna oavsett skördetidpunkt. Engelskt rajgräs har tidigare påvisats ha hög smältbarhet och bestå av högre NSC-halter i jämförelse med andra tempererade gräsarter, vilket kan vara förklaringen till den relativt snabbt ackumulerar en hög gasvolym (Thorvaldsson et al., 2002; Allen et al., 2013; Jensen et al., 2014).

Den relativt låga gasproduktionen från sent skördad hundäxing, efter 6 h inkubation, kan tyda på att mängden NSC i sent skördad hundäxing var lägre i jämförelse med till exempel engelskt rajgräs och rörsvingel oavsett skördetidpunkt.

Efter 18 och 24 h inkubation fanns det ingen skillnad i total gasproduktion mellan arterna vid sen skörd. Det kan tyda på att lignifieringen av gräsens cellväggar, som sker under senare delar av utvecklingen, hade större påverkan än artens egenskaper på den andel av gräset som fermenterades (Frame & Laidlaw, 2011).

5.2 Fermentationshastighet

Det botaniska utvecklingsstadiet är det som i högst grad påverkar nedbrytningen av ett gräs (Ragnarsson & Lindberg, 2008). Engelskt rajgräs är en art som i tidigt botaniskt utvecklingsstadium kan innehålla höga halter av NSC (Jensen et al., 2014). Om höga mängder NSC når grovtarmen kan dessa brytas ned snabbt och skapa en

hög fermentationshastighet (Garber *et al.*, 2018) vilket i kombination med den tidiga skörden kan förklara varför tidigt skördat engelskt rajgräs efter 5 h inkubation hade den högsta fermentationshastigheten (NmL/h) i jämförelse med övriga kombinationer av gräsart och skördetillfälle, bortsett från tidigt skördad hundäxing.

Efter 6 h var fermentationshastigheten för sent skördad foderlosta likvärdig med tidigt skördat engelskt rajgräs. Det är anmärkningsvärt då det senare utvecklingsstadiet bör ha inneburit att foderlostan innehöll en högre andel NDF och lignifierad vävnad än de tidiga skördarna och därför borde gett en lägre fermentationshastighet. Fermentationshastigheterna som uppmättes efter 9, 12, 15, 18, 21 och 24 h inkubation visade inte någon förhöjd fermentationshastighet för sent skördad foderlosta vilket indikerar att den förhöjda fermentationen vid 6 h sannolikt är ett resultat av ett högt innehåll av NSC som har förbrukats snabbt av mikroberna (Ince *et al.*, 2013). Sent skördad foderlosta hade en hög fermentation efter 6 h och inte efter 5 h som för tidigt skördat engelskt rajgräs. Förklaringen till den förskjutna gasproduktionen kan vara att den sent skördade foderlostan innehöll NSC som utgjordes av fruktaner med högt DP som först degraderas till monosackarider innan de snabbt kunde fermenteras. Det har tidigare visats att fruktaner med högre DP fermenteras långsammare än kortkedjiga fruktaner (Ince *et al.*, 2013; Harlow *et al.*, 2017). Tidigare analyser som genomförts på foderlosta har inte visat på högre NSC vid senare skörd än andra tempererade gräsarter (Undersander, 2013; Jensen *et al.*, 2014).

I vilken hastighet gas bildas är relevant att ta hänsyn till då en snabb och stor fermentation i grovtarmen kan påverka hästen negativt. Om hastigheten för gasackumulering överskrider den för vilken gasen kan avlägsnas från tarmen kan hästen drabbas av gaskolik (Berg *et al.*, 2005; Cunha, 2012).

5.2.1 Botaniskt utvecklingsstadium

En av hypoteserna i den här studien var att gräs skördade i ett sent botaniskt utvecklingsstadium skulle ge långsammare gasproduktion jämfört med gräs skördade i tidigare stadium. Skördetidpunkten hade vid 4, 12, 15 och 18 h inkubation effekt på fermentationshastigheten oberoende av gräsart. Den tidiga skörden gav högre gasproduktion per timme i jämförelse med den sena skörden, vid de fyra angivna mätillfällena. Det är i linje med resultat från tidigare studier som visat att en senarelagd förstaskörd ökar andelen NDF i gräs samtidigt som torrsubstansens smältbarhet minskar (Ragnarsson & Lindberg, 2008). Utifrån de här resultaten kan det vara möjligt att påverka intaget av snabbt fermenterade kolhydrater och undvika riskfaktorer för olika hästkategorier genom att styra tidpunkten för förstaskörd eller betessläpp.

5.2.2 Gräsarter

Hundäxing hade efter 15, 18 och 21 h en högre fermentationshastighet än rörsvingel. Då detta är relativt sent under inkubationsfasen behöver inte resultatet vara en effekt av ett högt innehåll av NSC i hundäxing. Vid fermentation av stora mängder odegraderad NSC i hästens grovtarm sker en ökad produktion av laktat (Milinovich *et al.*, 2006; Al Jassim & Andrews, 2009). Mängden laktat som produceras reflekteras inte av gasproduktion, utan det är mängden VFA som produceras som avgör gasproduktionen (McDonald *et al.*, 2002). I det fall att rörsvingel innehöll högre halter NSC än hundäxing samt att dessa fermenterades tidigt under inkuberingsfasen vilket resulterade i en hög produktion av laktat skulle det kunna innebära att pH-värdet i inkuberingsflaskornas innehåll sjönk och hämmade effekten av de fibrolytiska bakterierna (Milinovich *et al.*, 2006; Al Jassim & Andrews, 2009). Det kan i sin tur innebära att det fanns odegraderad NDF kvar i inkuberingsflaskorna med rörsvingel medan andelen fibrolytiska bakterier i flaskorna med hundäxing var större och fortsatt aktiva under en längre tid. Hundäxing kan således få en mer utdragen fermentationskurva som resultat av lägre innehåll av NSC som tillslut överskred fermentationshastighet från rörsvingel. För att ta reda på mer om vad som skedde i flaskorna under inkuberingsfasen hade det varit intressant att göra pH-mätningar i samband med att det skedde kraftig gasproduktion alternativt efter avslutad inkubation. Resultat som hade kunnat ge indikationer på om laktatnivåerna och pH-värdena nådde så pass låga nivåer, att det hade kunnat påverka gräsets nedbrytning. Eftersom inga pH-mätningar genomfördes är teorin endast ett antagande. Buffertlösningen, som blandades tillsammans med substrat och inokulant, talar emot att pH sjönk så pass lågt att det påverkade resultatet likt beskrivit ovan.

5.3 Faktorer som påverkar gasproduktionen

Gräsets kemiska sammansättning och tillväxtmönster är en komplex process som påverkas av arternas genetiska egenskaper och reglerande mekanismer i interaktion med yttre miljöfaktorer (Nordheim-Viken & Volden, 2009). För att kunna jämföra nedbrytningen av olika gräsarter användes i den här studien gräs odlade på samma plats, med samma typ av behandling och skördade på samma datum (Shewmaker *et al.*, 2006).

Den mikrobiella sammansättningen i hästens träck gällande närvarande arter samt koncentrationen av dessa kan variera mellan olika hästar (Murray *et al.*, 2009). En effekt av den individuella mikrobfloran skulle kunna vara att den fermentativa kapaciteten skiljer sig åt mellan olika individer (Murray *et al.*, 2009). Således kan inokulatets mikrobiella sammansättning vara en faktor som påverkat resultatet i den

här studien (Murray *et al.*, 2012). Vid varje försökstillfälle togs träck från två slumpmässigt utvalda hästar ur en besättning om 20 hästar, som fick samma foder, vilket reducerade risken att en enskilds individs mikroflora skulle påverka resultaten för de olika omgångarna. Kontrollproverna som innehöll sukros gav gaskurvor som följde två olika gasprofiler (figur 8) vilket kan varit en effekt av mikrosammansättningen i inokulatet. Kontrollproverna med halm gav gasprofiler som liknade varandra (figur 8) vilket indikerade att den mikrosammansättningen i de olika inokulaten inte skilde sig från varandra. Vid jämförelse mellan de olika omgångarna fanns dock ingen skillnad i gasproduktion, vilket indikerar att den mikrobiella sammansättningen i inokulatet inte påverkat resultatet. Även om det inte utesluter att det fanns skillnader mellan mikrosammansättningen i inokulaten verkar det inte systematiskt påverkat gasproduktionen i proverna. Sukrosproverna hade en längre lagfas jämfört med övriga substrat, troligen speglar detta tiden det tar för mikrofloran att ställa om till att nyttja sukros som substrat. *In vivo* bryts sukros ner till glukos- och fruktosmolekyler och absorberas från tunntarmen innan digestan når grovtarmen (Frape, 2010). Teorier om att den individuella mikrofloran kan vara en bakomliggande faktor till varför vissa individer drabbas av fång eller gaskolik till följd av ett stort NSC-intag behöver utredas vidare

5.4 Framtida forskning

Vidare forskning behövs gällande hur fermentationen och den ackumulerade gasvolymen från olika gräsarter kan påverka hästen. Förutom att jämföra och titta på mängden WSC i olika gräsarter är det även relevant att titta på andelen fibrer och deras smältbarhet då de är avgörande för mängden energi hästen kan nyttja från den mikrobiella fermentationen (Harris *et al.*, 2017). Förutom hälsoriskerna som kan föreligga kring hästens intag av NSC finns även problematik med övervikt och fetma som kommer från ett för högt energiintag.

Metoden som användes i den här studien är inte en replika av alla steg som sker i hästens mag-tarmkanal. Substraten som inkuberades genomgick inte någon förbehandling för att efterlikna de enzymatiska och kemiska processer som sker i hästens magsäck och tunntarm. Substraten som inkuberades var intakta och innehöll fortfarande protein, fett och hydrolyserbara kolhydrater som *in vivo* skulle brutits ned i hästens tunntarm (Frape, 2010). Gräsprovernas sammansättning motsvarade således inte den digesta som når grovtarmen i en *in vivo* situation (Abdouli & Attia, 2007). Gas *in vitro* tekniken tar heller inte hänsyn till syntesen av mikrobiell biomassa som sker (McDonald *et al.*, 2002). Hydrolyserbara kolhydrater hade troligen en effekt på gasproduktion men i vilken utsträckning gräsets innehåll av protein och fett bidrog till den totala gasproduktionen är okänt. För att fastställa vilken effekt fett, protein

och hydrolyserbara kolhydrater hade på gasproduktionen bör försök genomföras där intakta gräs jämförs med gräs där de komponenter som borde brutits ner innan grovtarmen, genom förbehandling med till exempel saltsyra, pepsin och amylas innan inkubation. Tidigare forskning indikerar att enzymatisk förbehandling inte är nödvändig för fiberrika substrat då de generellt innehåller en låg andel protein och fett i relation till fiber och inte kommer påverka gasproduktionen i någon betydande utsträckning (Abdouli & Attia, 2007). Osäkerheten i den genomförda studien ligger dock huvudsakligen i vilken mängd av glukos, fruktos och sukros som når grovtarmen hos hästen och i hur stor utsträckning resultatet i den här studien reflekterar den gasproduktionen som hade skett *in vivo* hos häst.

Med *in vitro*-inkubation försvinner också effekten av de reglerande funktioner som normalt sker i hästen och som kan påverka fermentationen i grovtarmen. Till exempel kan mikrobernas nedbrytningskapacitet påverkas av den uteblivna tillförsel av den digesta som sker *in vivo* till grovtarmens mikrober (Franzan *et al.*, 2018). Det bör också tas i beaktande att näringsämnen och VFA som normalt sett skulle absorberats över tarmväggen istället förblir i inkuberingskärlet och kan påverka den aktiva bakteriepopulationen.

Ackumulering av gas under *in vitro*-inkubation kan kopplas till smältbarheten av den organiska substansen i ett foderprov (Murray *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2014; Franzan *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). För att fastställa *in vitro*-smältbarheten för gräsproverna i denna studie skulle prover från flaskornas innehåll samlats in efter avslutad inkubation för vidare analys av vad och hur mycket av gräset som brutits ned. Forskning behövs för att skaffa *in vivo*-referenser för olika gräsarter. Genom att jämföra smältbarheten för gräsarter från *in vivo*-försök med resultat från *in vitro*-metoden, använd i denna studie, kan *in vitro*-metodens resultat kopplas med data från smältbarhetsförsöken *in vivo*. På så vis kan smältbarheten för olika gräsarter i framtiden skattas utifrån fermentationen i *in vitro*-metoden. *In vitro*-metoder är ett snabbt och billigt alternativ till försök med levande hästar och möjliggör utvärdering av en större mängd fodermedel till häst. Genom att byta ut *in vivo*-försök med *in vitro*-försök kan användandet av försökshästar minskas, vilket är i linje med 3R-principen (replace, reduce, refine). Fokus bör läggas på att utvärdera *in vitro*-metoden för olika typer av gräs för att i framtiden kunna ge rekommendationer om lämpliga arter och skördetidpunkter för olika hästkategorier. Gräsarternas genetiska förutsättningar gör att deras svar på omgivande faktorer kan variera och olika arter kan reagera annorlunda på lokala förutsättningar vilket gör det svårt att utifrån endast den här studien göra generella antaganden om gräsarter.

5.5 Slutsats

Det fanns interaktionseffekter mellan skördetidpunkt och gräsart både avseende ackumulerad gasvolym och fermentationshastighet. I tidig skörd hade engelskt rajgräs högre ackumulerade gasvolym än tidigt skördad timotej och hundäxing. Efter 6 h inkubation hade sent skördad foderlosta och tidigt skördat engelskt rajgräs högre fermentationshastighet än övriga tidigt skördade arter, förutom från tidigt skördad hundäxing. Sent skördad hundäxing hade lägre gasproduktion än alla skördar av engelskt rajgräs och rörsvingel. Vid fyra mättillfällen hade tidigt skördade gräs högre fermentationshastighet jämfört med sent skördade gräs. Utifrån den här studien drogs slutsatsen att gasproduktionen skiljer sig mellan olika gräsarter och skördetillfällen vid *in vitro*-fermentation av gräsprover med hästräck som inokulant. Således kan valet av gräsart och skördetidpunkt ha betydelse för hur gräset fermenteras i hästens grovtarm.

Referenslista

- Abdouli, H and S. B. Attia. 2007. Evaluation of a two-stage *in vitro* technique for estimating digestibility of equine feeds using horse feces as the source of microbial inoculum. *Animal Feed Science and Technology*. 132, 155-162.
- Akhter, S., Owen, E, Theodorou, M.K., Butler, E.A. & Minson, D.J. (1999). Bovine faeces as a source of micro-organisms for the *in vitro* digestibility of forages. *Grass Forage Science*. 54, 219-226.
- Al Jassim, R.A.M. & Andrews, F.M. (2009). The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis laminitis, colic and stomach ulcers. *Vet Clin Equine*. 25, 199-215.
- Allen, E., Sheaffer, C. & Martinson, K. (2013). Forage Nutritive Value and Preference of Cool-Season Grasses under Horse Grazing. *Agronomy Journal – Crop Economics, Production & Management*. 3, 679-684.
- Archer, D. C., & Proudman, C. J. (2006). Epidemiological clues to preventing colic. *The Veterinary Journal*. 172, 29-39
- Asplin, K.E., Sillence, M.N., Pollitt, C.C., McGowan, C.M. (2007). Equine laminitis-Induced by hyperinsulinaemia in ponies. *The Veterinary Journal*, 174: 530-535.
- Bailey, S.R., Rycroft, A. & Elliott, J. (2002). Production of amines in equine cecal contents in an *in vitro* model of carbohydrate overload. *Journal of Animal Science*. 80, 2656-2662.
- Bailey, S.R., Marr, C. M. & Elliott, J. (2004). Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *Veterinary Journal*. 167, 129–142.
- Bailey, S.R., Menzies-Gow., N.J., Harris, P.A., Habershon-Butcher, J.L., Crawford, C., Berhane, Y., Boston, R.C. & Elliott, J. (2007). Effect of dietary fructans and dexamethasone administration on the insulin response of ponies predisposed to laminitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 9, 1365-1373.
- Bentz, B. G. (2004). *Understanding Equine Colic*. 1 edition. Lexington: Eclipse Press
- Berg, E. L., Fu, C. J., Porter, J. H., Kerley, M. S. (2005). Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: Effects on fecal pH, microbial content and volatile fatty acid concentrations. *Journal of Animal Science*. 83, 1549-1553.
- Bergero, D., Peiretti, P.G. & Cola, E. (2002). Intake and apparent digestibility of perennial ryegrass haylages fed to ponies either at maintenance or at work. *Livestock production science*. 77, 325-329.

- Burns, T.A., Watts, M.R., Weber, P.S., McCutcheon L.J., Geor, R.J., Belknap, J.K. (2013). Distribution of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in the digital laminae of mixed-breed ponies: an immunohistochemical study. *Equine Veterinary Journal*. 45, 326-332.
- Chatterton, N.J., Harrison, P.A., Bennett, J.H. & Asay, K.H. (1989). Carbohydrate partitioning in 185 accessions of gramineae grown under warm and cool temperatures. *Journal of Plant Physiology*. 134. 169-179.
- Coenen, M., Mößeler, A. & Vervuert, I. (2006). Fermentative Gases in Breath Indicate that Inulin and Starch to Be Degraded by Microbial Fermentation in the Stomach and Small Intestine of the Horse in Contrast to Pectin and Cellulose. *Journal of Nutrition*. 136. 218S-2110S.
- Crozier, J.A., Allen, V.G., Jack, N.E., Fontenot, J.P. & Cochran, M.A. (1997). Digestibility, apparent mineral absorption, and voluntary intake by horses fed alfalfa, tall fescue, and caucasian bluestem. *Journal of Animal Science*. 6, 1651-1658.
- Cunha, T. J. (2012). Horse feeding and nutrition. Academic Press
- Cymbaluk, N.F. & Christensen, D.A. (1986). Nutrient utilization of pelleted and unpelleted forages by ponies. *Can. J. Anim. Sci.* 66, 237-244.
- Cymbaluk, N.F. (1990). Comparison of forage digestion by cattle and horses. *can. J. Anim. Sci.* 70, 601-610.
- Darlington, J.M. & Hershberger, T.V. (1968) Effect of Forage Maturity on Digestibility, Intake and Nutritive Value of Alfalfa, Timothy and orchardgrass by equine. *Journal of animal science*. 27, 1572-1576.
- De Fombelle, A., Varloud, M., Goachet, A., Jacotot, E., Philippeau, C., Drogoul, C., & Julliand, V. (2003). Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. *Animal Science*. 77, 293-304.
- De Laat, M.A., McGowan, C.M., Sillence, M.N. & Pollitt, C.C. (2010). Equine laminitis: Induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*. 42, 2.
- Desrousseaux, G., Santos, A.S., Pellikaan, W.F., Van der Poel, A.F.B., Cone, J.W., Guedes, C.M.V., Ferreira, L.M.M. & Rodrigues, M.A.M. (2012). Effect of collection time on the fermentative activity of microbes in equine faeces. *Animal Feed Science and Technology*. 178. 183-189.
- Elghandour, M.M.Y., Vázquez Chagoyán, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Martinez Castaneda, J.S., Camacho, L.M. & Buendia, G. (2014). *In vitro* Fermentative Capacity of Equine Fecal Inocula of 9 fibrous Forages in the Presence of Different Doses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Equine Veterinary Science*. 34, 619-625.
- Fonnesbeck, P.V. (1968). Digestion of Soluble and Fibrous Carbohydrate of Forage by Horses. *Journal of animal science*. 27, 1336-1344.
- Frame, J. & Laidlaw, A.S. (2011). *Improved Grassland Management, New Edition*. Ramsbury: Crowood.
- Frank, N., Geor, R., Bailey, S., Durham, A. and Johnson, P. (2010). Equine Metabolic Syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 24, 467-475.
- Franzan, B.C., Franco, T.W., Stefani, G., Pereira, M.M., Almeida, F.Q.D & Silvia, V.P. (2018). Equine fecal inoculum optimization in *in vitro* fermentation assays of dehydrated roughage. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 47.
- Frape, D. (2010). *Equine Nutrition and Feeding*. Fourth edition. Wiley-Blackwell. Oxford, UK.
- Garber, A., Hastie, P.M., Handel, I. & Murray, J.M.D. (2018). *In vitro* fermentation of different ratios of alfalfa and starch or inulin incubated with an equine faecal inoculum. *Livestock Science*. 215, 7-15.
- Geor, R.J. (2010a). Current concepts on the pathophysiology of pasture associated laminitis. *Veterinary Clinics Equine*. 26, 265-276.

- Geor, R.J. (2010b). Nutrition and Exercise in the management of Horses and Ponies at High Risk for Laminitis. *Journal of Equine Veterinary Science*. 30, 463-470.
- Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A. & Lantinga, E.A. (1996). Multi-phasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science Technology*. 64, 77-89.
- Harber, L.H., McNally, L.K. & Smith, W.H. Digestibility of Three Grass Hays by the Horse and Scanning Electron Microscopy of undigested leaf remnants. *Journal of animal science*. 53, 1671
- Harlow, B.E., Kagan, I.A., Lawrence, L.M. & Flythe, M.D. (2017). Effects of Inulin Chain Length on Fermentation by Equine Fecal Bacteria and *Streptococcus bovis*. *Journal of Equine Veterinary Science*. 48, 113-120.
- Harris, P.A., Ellis, A.D., Fradinho, M.J., Jansson, A., Julliard, V., Luthersson, N., Santos, A.S. & Vervuert, I. (2017). Review: Feeding conserved forage to horses: recent advances and recommendations. *Animal*. 11, 958-967.
- Hoffman, R.M., Wilson, J.A., Kronfeld, D.S., Cooper, W.L., Lawrence, L.A., Sklan, D. & Harris, P.A. (2001). Hydrolyzable carbohydrates in pasture, hay and horse feeds: Direct assay and seasonal variation. *Journal of Animal Science*. 79, 500-506.
- Hoffman, R.M., Boston, R.C., Stefanovski, D., Kronfeld, D.S., Harris, P.A. (2003). Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in thoroughbred geldings. *Journal of animal science*. 81, 2333-2342.
- Hoffman, R.M. (2013). Carbohydrates. In: *Equine clinical and applied nutrition*. (ed. Geor, R.J., Harris, P.A., Coenen, M.) 3-32. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Humphreys, M.W., Yadav, R.S., Cairns, A.J., Turner, L.B., Humphreys, J. & Skøt, L. (2006). A changing climate for grassland research. *New Phytologist*. 169, 9-26.
- Ince, J., Longland, A., Moore-Colyer, M. & Harris, P. (2013). *In vitro* degradation of grass fructan by equid gastrointestinal digesta. *Grass and Forage Science*. 69, 514-523.
- Jensen, K.B., Harrison, P., Chatterton, N.J., Bushman, B.S. & Creech, J.E. (2014). Seasonal Trends in Nonstructural Carbohydrates in Cool- and Warm-season Grasses. *Crop Science*. 54, 2328-2340.
- Johnson, P.J. (2002). The Equine Metabolic Syndrome: Peripheral Cushing's Syndrome. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 18, 271-293
- Kagan, I.A., Kirch, B.H., Thatcher, C.D., Strickland, J.R., Teutsch, C.D., Elvinger, F. & Pleasant, R.S. (2011). Seasonal and Diurnal Variation in Simple Sugar and Fructan Composition of Orchardgrass Pasture and Hay in the Piedmont Region of the United States. *Journal of Equine Veterinary Science*. 31, 488-497.
- Kagan, I.A., Lawrence, L.M., Seman, D.H., Prince, K.J., Fowler, A.L. & Smith, S.R. (2018). Effects of Sampling Time, Cultivar and Methodology on Water- and Ethanol-Soluble Carbohydrate Profiles of Three Cool-Season Grasses in Central Kentucky. *Journal of Equine Veterinary Science*. 61, 99-107.
- Liu, J., Gorp, J.R.v. & Nistor, M. (2018). The new Gas Endeavour system from Bioprocess Control AB for *in vitro* assessment of animal feeds. In: Udén, P., Eriksson, T., Spörndly, R., Rustas, B.O. & Liljeholm, M. (red.) *Proceedings of the 9th Nordic Feed Science Conference*. Uppsala, Sweden.
- Longland, A.C. & Byrd, B.M. (2006). Pasture Nonstructural Carbohydrates and Equine Laminitis. *The Journal of Nutrition*. 136, 20099S-2102S.
- Longland A.C. (2012). Nutritional assessment of forage quality. In: Saastamoinen M., Fradinho M.J., Santos A.S., Miraglia N. Forages and grazing in horse nutrition, vol 132. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Maleux, K. & van den Ende, W. (2007). Levans in Excised Leaves of *Dactylis glomerata*: Effects of Light, Sugars, Temperature and Senescence. *Journal of Plant Biology*. 50, 671-680.

- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A. & Wilkinson, R.G. (2002). *Animal Nutrition*. Seventh Edition. Pearson. Harlow, England.
- Milunovich, G.J., Trott, D.J., Burrell, P.C., Van Eps, A.W., Thoenner, M.B., Blackall, L.L., Al Jassim, R.A.M., Morton, J.M. & Pollitt, C.C. (2006). Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environmental Microbiology*. 8, 885-898.
- Maleux, K. & Van den Ende, W. (2007). Levans in Excised Leaves of *Dactylis Glomerata*: Effects of Light, Sugars, Temperature and Senescence. *Journal of Plant Biology*. 50, 671-680.
- Mauricio, R.M., Owen, E., Mould, F.L., Givens, I., Theodorou, M.K., France, J., Davies, D.R. & Dhanoa, M.S. (2001). Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*. 1-2, 33-48.
- Merritt, A.M. & Julliard, V. (2013). Gastrointestinal Physiology. In: *Equine clinical and applied nutrition*. (ed. Geor, R.J., Harris, P.A., Coenen, M.) 3-32. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Moffitt, D.L., Meacham, T.N., Fontenot, J.P. and Allen, V.G., 1987. Seasonal differences in apparent digestibilities of fescue and orchardgrass/clover pastures in horses. Proc. 10th Equine Nutr. Physiol. Soc. Symp. 79-86.
- Mungall, B. A., Kyaw-Tanner, M. & Pollitt, C. C. (2001) *In vitro* evidence for a bacterial pathogenesis of equine laminitis. *Veterinary Microbiology*. 79, 209-223.
- Murray, J-A.M.D., Longland, A.C., Moore-Colyer, J.S. & Dunnett. (2005). The effect of enzyme treatment on the *in vitro* fermentation of Lucerne incubated with equine faecal inocula. *British Journal of Nutrition*. 94, 771-782.
- Murray, J-A.M.D., Scott, B., Hastie, P. M. (2009). Fermentative capacity of equine faecal inocula obtained from clinically normal horses and those predisposed to laminitis. *Animal Feed Science and Technology*. 151, 306-311.
- Murray J-A.M.D., McMullin, P., Handel, I. & Hastie, P.M. (2012). The effect of freezing on the fermentative activity of equine faecal inocula for use in an *in vitro* gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*. 3-4, 175-182.
- Murray, J-A.M.D., McMullin, P., Handel, I. & Hastie, P.M. (2014). Comparison of intestinal contents from different regions of the equine gastrointestinal tract as inocula for use in an *in vitro* gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*. 187, 98-103.
- Miyaji, M., Ueda, K., Kobayashi, Y., Hata, H. & Kondo, S. (2008). Fiber digestion in various segments of the hindgut of horses fed grass hay or silage. *Animal Science Journal*. 79, 339-346.
- Nordheim-Viken, H. & Volden, H. (2009). Effect of maturity stage, nitrogen fertilization and seasonal variation on ruminal degradation characteristics of neutral detergent fibre in timothy (*Phleum pratense* L.) *Animal Feed Science and Technology*. 149, 30-59.
- Pollitt, C.C. (2004). Equine laminitis. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 3, 34-44.
- Pollock, C.J., Lloyd, E.J., Stoddart, J.L. & Thomas, H. (1983). Growth, photosynthesis and assimilate partitioning in *Lolium temulentum* exposed to chilling temperatures. *Physiologia Plantarum*. 59, 257-262.
- Rasmussen, S., Parsons, A.J. & Jones, C.S. (2011). Metabolomics of forage plants: a review. *Annals of Botany*. 110, 1281-1290.
- Ragnarsson, S. & Lindberg, J.E. (2008). Nutritional value of timothy haylage in Icelandic horse. *Livestock Science*. 113, 202-208.
- Redmond, L.M., Cross, D.L., Jenkins, T.C. & Kennedy, S.W. (1999). The effect of *Acremonium coenophialum* on intake and digestibility of tall fescue hay horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 4, 215-219.

- Ringmark, S., Roepstorff, L., Essén-Gustavsson, B., Revold, T., Lindholm, A., Hedenström, U., Rundgren, M., Ögren, G. & Jansson, A. (2013). Growth, training response and health in Standardbred yearlings fed a forage-only diet. *Animal*. 7, 746-753.
- Santos, A.S., Cabo A.D., Lima, S.M., Ferreira, L.M. & Rodrigues, M.A.M. (2012). Fermentation parameters of equine caecal and faecal inocula. In: Saastamoinen, M., Fradinho, M.J., Santos, A.S. & Miraglia, N. Forages and grazing in horse nutrition. 132. *Wageningen Academic Publishers*, Wageningen.
- Shewmaker, G.E., Mayland, H.F., Roberts, C.A., Harrison, P.a., Chatterton, N.J. & Sleper, D.A. (2006). Daily carbohydrate accumulation in eight tall fescue cultivars. *Grass and Forage Science*. 61, 413-421.
- Shirazi-Beechey, S. P. (2008). Molecular insights into dietary induced colic in the horse. *Equine Veterinary Journal*. 40 (4), 414-421.
- Sponheimer, M., Robinson, T., Roeder, B., Hammer, J., Ayliffe, L., Passey, B., Cerling, T., Dearing, D. & Ehleringer, J. (2003). Digestion and passage rates of grass hays by llamas, alpacas, goats, rabbits, and horses. *Small Ruminant Research*. 48, 149–154.
- Stevens, D.M., Van Ryssen, J.B.J. & Marais, J.P. (2002). The use of n-alkane markers to estimate the intake and apparent digestibility of ryegrass and Kikuyu by horses. *South African Journal of Animal Science*. 32, 50-56.
- Särkijärvi, S., Sormunen-Cristian, R. Heikkilä, T., Rinne, M. & Saastamoinen, M. (2012). Effect of grass species and cutting time on *in vivo* digestibility of silage by horses and sheep. *Livestock Science*. 144, 230-239.
- Thorvaldsson, G., Tremblay, G.F. & Kunelius, H.T. (2007). The effects of growth temperature on digestibility and fibre concentration of seven temperate grass species. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 57:4, 322-328.
- Udén, P., & Van Soest, P. (1982). Comparative digestion of timothy (*Phleum pratense*) fibre by ruminants, equines and rabbits. *British Journal of Nutrition*. 47, 267-272.
- Undersander, D. (2013). Grass Varieties for Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33, 315-320.
- Van Eps, A.W. & Pollitt, C.C. (2006). Equine laminitis induces with oligofructose. *Equine Veterinary Journal*. 38. 203-208.
- Van Weyenberg, S., Sales, J. & Janssens, G.P.J. (2006). Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: A review. *Livestock Science*. 99, 3-12.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Betydelsen av att välja rätt gräs till din häst

Grovfoder utgör basen i hästens diet och består huvudsakligen av gräs från betes- eller slåttervall. Att välja ett grovfoder med rätt energi och näringsinnehåll bidrar till att hålla hästen frisk och i korrekt hull. Gräs består framför allt av kolhydrater som kan delas in i strukturella och icke-strukturella. De strukturella kolhydraterna utgör den största delen av ett gräs och tar längre tid för hästen att bryta ned än de icke-strukturella. Olika gräsarters innehåll av kolhydrater styrs av tid på säsongen, grässets genetiska förutsättningar samt yttre faktorer så som temperatur, tillgång på näring och vatten.

Hästen är en grovtarmsjäsnare vilket innebär att den huvudsakliga fodernedbrytningen sker av bakterier i hästens grovtarm. När bakterierna bryter ned foder bildas förutom energirika föreningar även gas som en biprodukt. Icke-strukturella kolhydrater bryts ned relativt snabbt och ett högt intag kan leda till att stora mängder gas och mjölksyra bildas. Det kan leda till rubbningar i grovtarmens pH-värde vilket kan påverka den aktiva bakteriekulturen negativt. För hästen kan det innebära ökad risk för fång och kolik.

I färskt hästräck finns en levande bakterieflora som i hög utsträckning liknar den som finns i hästens grovtarm. Traditionellt har olika fodermedel utvärderats till häst genom användning av levande hästar med fistulerade grovtarm. Genom att byta ut försök på levande hästar med försök på laboratorium kan en större mängd fodermedel utvärderas och användandet av försökshästar minskas. I detta examensarbete genomfördes ett försök där olika gräsarter inkuberades med hästräck i förslutna glasflaskor för att mäta mängden gas som bildas när bakterierna bryter ned innehållet i olika gräsarter. Genom att mäta mängden gas och med vilken hastighet den bildas kan olika gräsarter och skördetidpunkter jämföras och slutsatser dras om vilken gräsart som kan innehålla höga mängder snabbt förjäsbara substrat och därför kan vara mer eller mindre lämpade som foder till hästar. Gräsen som studerades var

engelskt rajgräs, timotej, foderlost, ängssvingel, hundäxing och rörsvingel och alla gräsen skördades vid tre olika mognadsstadier.

Resultatet visade att gasproduktionen skilde mellan olika gräsarter och skördetillfällen. Tidigt skördat engelskt rajgräs hade den högsta mängden producerad gas och den högsta fermentationshastigheten i jämförelse med majoriteten av gräsarterna oavsett skördetidpunkt. Vilket indikerade att engelskt rajgräs vid tidig skörd hade en högre koncentration av snabbt förjäsbara substrat. Sent skördad hundäxing gav en relativt låg gasproduktion i jämförelse med övriga gräsarter. Det fanns även skillnader mellan skördetillfällen; tidigt skördade gräs hade högre gasproduktion per timme än sent skördade gräs. Det indikerar att tidigt skördat gräs innehöll en högre andel snabbt förjäsbara substrat och skördetillfället kan således kopplas till gräsets innehåll och dess möjlighet att brytas ned av hästens bakterieflora. Utifrån resultaten i den här studien är det relevant att beakta både valet av gräsart samt hur olika gräsarter tillväxer och förändras över säsong för att ge hästen bra förutsättningar för ett lämpligt foderintag. Det behövs fortsatt forskning för att kunna ge rekommendationer om vilka gräsarter som är bäst lämpade för olika hästkategorier. Det behövs även forskning som jämför laboratorimetoden, som användes i den här studien, med metoder som genomförs med hästar. Detta för att kunna effektivisera utvärderingen av fodermedel till häst.

Tack

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare Cecilia Müller för engagemang, hjälp och vägledning genom både det praktiska arbetet och skrivprocessen. Jag vill även tacka laboratoriepersonalen på HUV för ert tålamod och hjälpsamma inställning, det gjorde jobbet både roligt och lärorikt. Tack till Elina Toss Ekmyr för att alltid ha lyssnat och fungerat som bollplank. Slutligen vill jag tacka vänner och familj som alltid stöttar och finns där.

Bilaga 1

Tabell A. Minsta kvadratmedelvärden (LSMeans) och signifikans för parvisa skillnader mellan kombinationer av gräsarter och skördetider beträffande fermentationshastighet efter 5 h in vitro-inkubation. LSmeans anges i Nml/h. Art 1 = engelskt rajgräs, 2 = timotej, 3 = foderlosta, 4=rörsvingel, 5= hundäxing, 6 = ängs-svingel. Skörd 1 = tidig, 2 = mediumskörd, 3 = sen skörd.

ART	SKORD	Y3 LSMEAN	Standard Error	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	64.0933333	4.5282085	<.0001	1
1	2	43.4716667	4.5282085	<.0001	2
1	3	38.2150000	4.5282085	<.0001	3
2	1	21.6066667	4.5282085	<.0001	4
2	2	23.2766667	4.5282085	<.0001	5
2	3	19.5083333	4.5282085	<.0001	6
3	1	28.6483333	4.5282085	<.0001	7
3	2	30.1166667	4.5282085	<.0001	8
3	3	29.1400000	4.5282085	<.0001	9
4	1	35.2616667	4.5282085	<.0001	10
4	2	24.2400000	4.5282085	<.0001	11
4	3	35.9483333	4.5282085	<.0001	12
5	1	45.4350000	4.5282085	<.0001	13
5	2	18.2483333	4.5282085	0.0001	14
5	3	14.3583333	4.5282085	0.0021	15
6	1	30.7566667	4.5282085	<.0001	16
6	2	20.9333333	4.5282085	<.0001	17
6	3	32.5966667	4.5282085	<.0001	18

Least Squares Means for effect ART*SKORD Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: Y3																		
I\J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		0.1345	0.0125	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	<.0001	0.0025	<.0001	0.0037	0.2665	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	0.0005
2	0.1345		1.0000	0.0819	0.1578	0.0322	0.6706	0.8171	0.7233	0.9980	0.2212	0.9993	1.0000	0.0174	0.0021	0.8681	0.0614	0.9621
3	0.0125	1.0000		0.4693	0.6580	0.2624	0.9890	0.9983	0.9937	1.0000	0.7595	1.0000	0.9996	0.1714	0.0338	0.9994	0.3967	1.0000
4	<.0001	0.0819	0.4693		1.0000	1.0000	0.9997	0.9969	0.9993	0.7901	1.0000	0.7223	0.0343	1.0000	0.9996	0.9931	1.0000	0.9584
5	<.0001	0.1578	0.6580	1.0000		1.0000	1.0000	0.9998	1.0000	0.9146	1.0000	0.8712	0.0724	1.0000	0.9948	0.9994	1.0000	0.9916
6	<.0001	0.0322	0.2624	1.0000	1.0000		0.9932	0.9697	0.9882	0.5659	1.0000	0.4880	0.0122	1.0000	1.0000	0.9491	1.0000	0.8394
7	<.0001	0.6706	0.9890	0.9997	1.0000	0.9932		1.0000	1.0000	0.9999	1.0000	0.9995	0.4496	0.9748	0.7276	1.0000	0.9991	1.0000
8	0.0001	0.8171	0.9983	0.9969	0.9998	0.9697	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.6154	0.9209	0.5653	1.0000	0.9929	1.0000
9	<.0001	0.7233	0.9937	0.9993	1.0000	0.9882	1.0000	1.0000		1.0000	1.0000	0.9998	0.5043	0.9616	0.6752	1.0000	0.9980	1.0000
10	0.0025	0.9980	1.0000	0.7901	0.9146	0.5659	0.9999	1.0000	1.0000		0.9573	1.0000	0.9796	0.4251	0.1207	1.0000	0.7237	1.0000
11	<.0001	0.2212	0.7595	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9573		0.9290	0.1076	1.0000	0.9847	0.9999	1.0000	0.9975
12	0.0037	0.9993	1.0000	0.7223	0.8712	0.4880	0.9995	1.0000	0.9998	1.0000	0.9290		0.9899	0.3542	0.0918	1.0000	0.6494	1.0000
13	0.2665	1.0000	0.9996	0.0343	0.0724	0.0122	0.4496	0.6154	0.5043	0.9796	0.1076	0.9899		0.0063	0.0007	0.6865	0.0249	0.8590
14	<.0001	0.0174	0.1714	1.0000	1.0000	1.0000	0.9748	0.9209	0.9616	0.4251	1.0000	0.3542	0.0063		1.0000	0.8825	1.0000	0.7216
15	<.0001	0.0021	0.0338	0.9996	0.9948	1.0000	0.7276	0.5653	0.6752	0.1207	0.9847	0.0918	0.0007	1.0000		0.4927	0.9999	0.3031
16	0.0002	0.8681	0.9994	0.9931	0.9994	0.9491	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9999	1.0000	0.6865	0.8825	0.4927		0.9856	1.0000
17	<.0001	0.0614	0.3967	1.0000	1.0000	1.0000	0.9991	0.9929	0.9980	0.7237	1.0000	0.6494	0.0249	1.0000	0.9999	0.9856		0.9312
18	0.0005	0.9621	1.0000	0.9584	0.9916	0.8394	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9975	1.0000	0.8590	0.7216	0.3031	1.0000	0.9312	

Tabell B. Minsta kvadratmedelvärden (LSMeans) och signifikans för parvisa skillnader mellan kombinationer av gräsarter och skördetider beträffande fermentationshastighet efter 6 h in vitro-inkubation. LSmeans anges i Nml/h. Art 1 = engelskt rajgräs, 2 = timotej, 3 = foderlost, 4=rörsvingel, 5= hundäxing, 6 = ängsvingel. Skörd 1 = tidig, 2 = mediumskörd, 3 = sen skörd.

ART	SKORD	Y S LSMEAN	Standard Error	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	35.9983333	2.8743334	<.0001	1
1	2	26.7866667	2.8743334	<.0001	2
1	3	31.2266667	2.8743334	<.0001	3
2	1	11.3350000	2.8743334	0.0002	4
2	2	14.7950000	2.8743334	<.0001	5
2	3	24.9516667	2.8743334	<.0001	6
3	1	19.6433333	2.8743334	<.0001	7
3	2	23.9400000	2.8743334	<.0001	8
3	3	36.8383333	2.8743334	<.0001	9
4	1	20.2033333	2.8743334	<.0001	10
4	2	13.3916667	2.8743334	<.0001	11
4	3	25.3800000	2.8743334	<.0001	12
5	1	22.9733333	2.8743334	<.0001	13
5	2	13.1700000	2.8743334	<.0001	14
5	3	9.9833333	2.8743334	0.0008	15
6	1	21.0483333	2.8743334	<.0001	16
6	2	12.5533333	2.8743334	<.0001	17
6	3	16.4700000	2.8743334	<.0001	18

Least Squares Means for effect ART*SKORD																		
Pr > t for H0: LSmean(i)=LSmean(j)																		
Dependent Variable: YS																		
Vj	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		0.7043	0.9993	<.0001	0.0002	0.3841	0.0132	0.2391	1.0000	0.0206	<.0001	0.4560	0.1398	<.0001	<.0001	0.0390	<.0001	0.0008
2	0.7043		0.9997	0.0268	0.2474	1.0000	0.9489	1.0000	0.5565	0.9755	0.1116	1.0000	1.0000	0.0971	0.0092	0.9940	0.0646	0.5091
3	0.9993	0.9997		0.0006	0.0124	0.9847	0.3022	0.9396	0.9953	0.3879	0.0038	0.9926	0.8463	0.0031	0.0002	0.5338	0.0018	0.0448
4	<.0001	0.0268	0.0006		1.0000	0.0971	0.8394	0.1782	<.0001	0.7599	1.0000	0.0734	0.2944	1.0000	1.0000	0.6172	1.0000	0.9983
5	0.0002	0.2474	0.0124	1.0000		0.5377	0.9992	0.7154	<.0001	0.9969	1.0000	0.4618	0.8555	1.0000	0.9992	0.9852	1.0000	1.0000
6	0.3841	1.0000	0.9847	0.0971	0.5377		0.9975	1.0000	0.2608	0.9994	0.3056	1.0000	1.0000	0.2747	0.0385	1.0000	0.1997	0.8165
7	0.0132	0.9489	0.3022	0.8394	0.9992	0.9975		0.9998	0.0066	1.0000	0.9852	0.9940	1.0000	0.9791	0.6267	1.0000	0.9520	1.0000
8	0.2391	1.0000	0.9396	0.1782	0.7154	1.0000	0.9998		0.1507	1.0000	0.4682	1.0000	1.0000	0.4300	0.0778	1.0000	0.3310	0.9261
9	1.0000	0.5565	0.9953	<.0001	<.0001	0.2608	0.0066	0.1507		0.0105	<.0001	0.3204	0.0827	<.0001	<.0001	0.0207	<.0001	0.0004
10	0.0206	0.9755	0.3879	0.7599	0.9969	0.9994	1.0000	1.0000	0.0105		0.9664	0.9981	1.0000	0.9553	0.5263	1.0000	0.9109	1.0000
11	<.0001	0.1116	0.0038	1.0000	1.0000	0.3056	0.9852	0.4682	<.0001	0.9664		0.2478	0.6405	1.0000	1.0000	0.9103	1.0000	1.0000
12	0.4560	1.0000	0.9926	0.0734	0.4618	1.0000	0.9940	1.0000	0.3204	0.9981	0.2478		1.0000	0.2209	0.0280	0.9998	0.1571	0.7534
13	0.1398	1.0000	0.8463	0.2944	0.8555	1.0000	1.0000	1.0000	0.0827	1.0000	0.6405	1.0000		0.6011	1.0000	0.4907	0.9782	
14	<.0001	0.0971	0.0031	1.0000	1.0000	0.2747	0.9791	0.4300	<.0001	0.9553	1.0000	0.2209	0.6011		1.0000	0.8890	1.0000	1.0000
15	<.0001	0.0092	0.0002	1.0000	0.9992	0.0385	0.6267	0.0778	<.0001	0.5263	1.0000	0.0280	0.1428	1.0000		0.3812	1.0000	0.9787
16	0.0390	0.9940	0.5338	0.6172	0.9852	1.0000	1.0000	1.0000	0.0207	1.0000	0.9103	0.9998	1.0000	0.8890	0.3812		0.8146	0.9996
17	<.0001	0.0646	0.0018	1.0000	1.0000	0.1997	0.9520	0.3310	<.0001	0.9109	1.0000	0.1571	0.4907	1.0000	1.0000	0.8146		0.9999
18	0.0008	0.5091	0.0448	0.9983	1.0000	0.8165	1.0000	0.9261	0.0004	1.0000	1.0000	0.7534	0.9782	1.0000	0.9787	0.9996	0.9999	