

Kolhydratsammansättning och *in vitro*- gasproduktion i gräs vid simulerat hästbete

*Carbohydrate composition and in vitro-gas production in grass
at simulated horse pasture*

Emma Lindahl



Examensarbete • 30 hp

Agronomprogrammet - husdjur

Uppsala 2020

Kolhydratsammansättning och *in vitro*-gasproduktion i gräs vid simulerat hästbete

Carbohydrate composition and in vitro-gas production in grass at simulated horse pasture

Emma Lindahl

Handledare: Cecilia Müller, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Examinator: Torsten Eriksson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurstitel: Självständigt arbete i husdjursvetenskap

Kursansvarig inst.: Institutionen för husdjursgenetik

Kurskod: EX0872

Program/utbildning: Agronomprogrammet - husdjur

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2020

Omslagsbild: Emma Lindahl

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: fermentation, gräsarter, hästbete, *in vitro*-gasproduktion, kolhydrater

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institution för husdjurens utfodring och vård

Sammanfattning

Hästen är en gräsätare som kan livnära sig på fiberrikt betesgräs som för många hästar utgör en stor del av dieten under sommaren. Betesgräs är i föränderligt tillstånd genom avbetning där faktorer som bland annat gräsets genetiska kapacitet, botaniskt utvecklingsstadium och klimat påverkar den näringsmässiga kvaliteten. Det saknas kunskap om hur avbetning vid upprepade tidpunkter inverkar på kolhydratsammansättningen hos olika gräsarter och om eller hur detta inverkar på hästens grovtarmsfermentation. Grovtarmsfermentation är svårt att mäta, men kan estimeras genom volymen producerad gas i *in vitro*-system där gräsprov inokuleras med träck från häst. I denna studie undersöktes därför kolhydratsammansättning och *in vitro*-gasproduktion (med hästräck som inokulant) hos sex olika gräsarter som provtagits vid fyra olika tidpunkter som en simulerad betessäsong. De gräsarter som undersöktes var engelskt rajgräs (*Lolium perenne*), foderlosta (*Bromus inermis*), hundäxing (*Dactylis glomerata*), rörsvingel (*Festuca arundinacea*), timotej (*Phleum pratense*) och ängsvingel (*Festuca pratensis*). Resultatet påvisade att det fanns interaktionseffekter mellan gräsart och avbetningstidpunkt på den kemiska sammansättningen i gräsproverna. Detta betyder att alla gräsarter inte svarade likadant på upprepad avbetning och foderlosta verkade inte klara den upprepade avbetningen då återväxten var låg. Engelskt rajgräs hade ett högt innehåll av lättlösliga kolhydrater (WSC) och lågt innehåll av fiber samtidigt som hundäxing hade ett lågt innehåll av WSC och högt innehåll av fiber i relation till de övriga gräsarterna. Innehållet av WSC och fiber hade generellt positiv respektive negativ korrelation med den totala gasproduktionen. Gräsarter med högt innehåll av WSC skulle därmed kunna orsaka större gasbildning, medan arter med högre fiberinnehåll kan ge lägre gasbildning både *in vitro* och *in vivo*. Det kan ha betydelse för gräsartens lämplighet i bete för olika kategorier av hästar, då stor och snabb gasproduktion kan innebära grovtarmsstörningar.

Nyckelord: fermentation, gräsarter, hästbete, *in vitro*-gasproduktion, kolhydrater

Abstract

The horse is a grass eater and can survive on fiber-rich pasture grass which contributes to a great part of the diet for many horses during summer. Pasture grass is constantly changing during frequent grazing, as factors like genetic capacity of the grass, stage of plant maturity and climate can affect the nutritional quality. There is lack of knowledge on how repeated grazing influence the carbohydrate composition in various grass species, and whether or how this further affects the fermentation in the hindgut of the horse. The hindgut fermentation is difficult to measure but can be estimated through the volume of produced gas in *in vitro* systems where grass samples are inoculated with horse *faeces*. In this study the carbohydrate composition and gas production from *in vitro* fermentation (with horse *faeces* as inocula) of six grass species harvested at four different times as a simulated grazing season were studied. The examined grass species were cocksfoot (*Dactylis glomerata*), brome grass (*Bromus inermis*), meadow fescue (*Festuca pratensis*), perennial ryegrass (*Lolium perenne*), tall fescue (*Festuca arundinacea*) and timothy (*Phleum pratense*). The results showed that interaction effects between grass species and grazing time were present for chemical composition in the grass samples. This means that all grass species did not respond similarly to repeated grazing, and brome grass did not seem to cope with the repeated grazing due to a low regrowth. Perennial ryegrass had high content of water soluble carbohydrates (WSC) and low concentration of fiber, while cocksfoot had a low content of WSC and high concentration of fiber in relation to the other grass species. The concentration of WSC had a positive correlation while the fiber content had a negative correlation with the total amount of produced gas. Thus, grass species with a high content of WSC may lead to greater gas formation, while species with higher fiber content may result in lower gas production. This may be of importance for hindgut fermentation disturbances in horses and therefore different grass species may have a varied suitability for pasture for different categories of horses.

Keywords: carbohydrates, fermentation, grass species, horse pasture, *in vitro*-gas production

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	6
Figurförteckning	7
1 Inledning	9
2 Litteraturgenomgång	11
2.1 Kolhydrater i betesgräs	11
2.2 Faktorer som inverkar på halten kolhydrater och dess smältbarhet i betesgräs	12
2.2.1 Gräsart	12
2.2.2 Botaniskt utvecklingsstadium	12
2.2.3 Klimat	13
2.2.4 Gödsling	14
2.2.5 Avbetning	15
2.3 Hästens digestion av kolhydrater	15
2.3.1 Hydrolys	16
2.3.2 Fermentation	16
2.3.3 Mikroflora	17
2.4 Olika metoder att mäta smältbarhet i fodermedel till häst	18
2.4.1 Mätning av gasvolym vid <i>in vitro</i> -fermentation	18
3 Material och metod	21
3.1 Gräsprover	21
3.2 Kemisk sammansättning	21
3.3 Gasmätningar <i>in vitro</i>	22
3.4 Insamling av <i>faeces</i> samt inkubering	23
3.5 pH-mätningar	24
3.6 Statistiska analyser	24
4 Resultat	25
4.1 Kemisk sammansättning	25
4.2 Gasmätningar <i>in vitro</i> med hästräck som inokulant	32
4.3 Fermentationshastighet	35
4.4 pH-mätningar	37
4.5 Gräsprovernans kemiska sammansättning och dess korrelation till gasproduktion <i>in vitro</i>	38

5	Diskussion	40
5.1	Kemisk sammansättning	40
5.2	Total gasvolym	42
5.3	Fermentationshastighet	43
5.4	pH	44
5.5	Gasproduktionstekniken	45
5.6	Begränsningar i studien	47
5.7	Slutsats	47
	Referenslista	49
	Tack	56
	Populärvetenskaplig sammanfattning	57

Tabellförteckning

Tabell 1. Effekt av art och avbetningstidpunkt på genomsnittlig kemisk sammansättning i betesprover. Prover har tagits vid upprepade tillfällen (avbetningstidpunkt) från samma parceller	26
Tabell 2. Pearson korrelationskoefficienter mellan total gasvolym vid <i>in vitro</i> -fermentation vid 6, 12 och 24 h och kemisk sammansättning i gräsprover	39

Figurförteckning

<i>Figur 1.</i> Fotografi över en andel av parcellerna på Vollebekk försöksgård, Norge i slutet av augusti 2019. (Foto: Cecilia Müller, SLU).	22
<i>Figur 2.</i> Genomsnittligt innehåll av neutral detergent fiber (NDF) i olika gräsarter	28
<i>Figur 3.</i> Genomsnittligt innehåll av lättlösliga kolhydrater (WSC) i olika gräsarter	29
<i>Figur 4.</i> Genomsnittligt innehåll av glukos i olika gräsarter	30
<i>Figur 5.</i> Genomsnittligt innehåll av sukros i olika gräsarter	30
<i>Figur 6.</i> Genomsnittligt innehåll av fruktan i olika gräsarter	31
<i>Figur 7.</i> Genomsnittligt innehåll av råprotein i olika gräsarter.	32
<i>Figur 8.</i> Total gasvolym i Nml över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det första avbetningstillfället (2019-07-03)	33
<i>Figur 9.</i> Total gasvolym i Nml över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det andra avbetningstillfället (2019-08-01)	33
<i>Figur 10.</i> Total gasvolym i Nml över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det tredje avbetningstillfället (2019-09-02)	34
<i>Figur 11.</i> Total gasvolym i Nml över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det fjärde avbetningstillfället (2019-10-29)	34
<i>Figur 12.</i> Fermentationshastighet i Nml/h över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det första avbetningstillfället	35
<i>Figur 13.</i> Fermentationshastighet i Nml/h över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det andra avbetningstillfället	36
<i>Figur 14.</i> Fermentationshastighet i Nml/h över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det tredje avbetningstillfället	36
<i>Figur 15.</i> Fermentationshastighet i Nml/h över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det fjärde avbetningstillfället	37
<i>Figur 16.</i> pH värdet efter 24 h inkubering, medel från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna	38

1 Inledning

Hästen är en utpräglad gräsätare som har en digestionskanal väl anpassad för att hästen skall kunna livnära sig på gräs (Pagan, 1998). Under en period på sommaren går många hästar på bete (Jordbruksverket, 2017). Betesgräset består till största delen av olika kolhydrater och dessa bryts ner i olika delar av hästens digestionskanal (McDonald *et al.*, 2011). Den huvudsakliga kolhydratfraktionen i betesgräs utgörs av strukturella kolhydrater som även kallas för fibrer. Både koncentrationen och smältbarheten av fibern förändras i takt med att gräsets botaniska utvecklingsstadium förändras (McDonald *et al.*, 2011).

Betesgräs innehåller också icke-strukturella kolhydrater som i tempererade gräsarter främst utgörs av sockerarterna glukos, fruktos och sukros samt fruktaner som tillsammans har samlingsnamnet lösliga kolhydrater (McDonald *et al.*, 2011). Innehållet av lösliga kolhydrater påverkas av olika faktorer och koncentrationen förändras både över dygnet (Bowden *et al.*, 1968) och betessäsongen (Williams *et al.*, 2019; Waite & Boyd, 1953). Om betesgräset innehåller stora mängder icke-strukturella kolhydrater, framför allt fruktan, kan produktionen av laktat i hästens grovtarm öka, vilket leder till ett sänkt pH (Hoffman, 2009; Longland & Byrd, 2006). Detta kan resultera i grovtarmsacidosis vilket kan leda till allvarliga komplikationer som till exempel utveckling av fång (Ince *et al.*, 2014; Longland & Byrd, 2006; Al Jassim *et al.*, 2005). Vissa substrat i grovtarmen kan också leda till överdriven gasproduktion vid fermentation av desamma, och om gasproduktionen är större än kapaciteten för upptag av gas kan hästen drabbas av kolik (Frape, 2010). I dagsläget saknas mycket kunskap om hur olika gräsarter svarar i sin kolhydratsammansättning på avbetning vid olika tidpunkter och hur detta inverkar på hästens grovtarmsfermentation.

För att utvärdera och studera nedbrytningen av olika gräsarter i hästens magtarmkanal kan olika metoder användas. *In vivo*-metoder är både tidskrävande och dyra och kräver försöksdjur (Särkijärvi *et al.*, 2012a; Martin-Rosset *et al.*, 2012). En annan metod, som hittills inte har använts i samma utsträckning för hästar som för andra djurslag, är *in vitro*-metodik med fermentation av foderprov. Sådan

metodik möjliggör att fler foderprover kan testas snabbare och till lägre kostnad (Murray *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2005). Med denna teknik mäts mängden producerad gas när foderprov inkuberas tillsammans med en aktiv mikroflora som ofta utgörs av färsk hästräck (Murray *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2009). Mängden ackumulerad gas och i vilken hastighet den produceras speglar fermentationen som sker i hästens grovtarm, och är ett indirekt mått på nedbrytningen av fodret i grovtarmen (Elghandour *et al.*, 2018; Blümmel & Ørskov, 1993).

Syftet med detta arbete var att undersöka kolhydratsammansättningen och gasproduktion (med *in vitro*-fermentation) i sex olika gräsarter som provtagits vid fyra olika tidpunkter över en betessäsong. Hypotesen var att den kemiska sammansättningen skiljer sig åt mellan olika gräsarter och avbetningstillfällen, vilket vidare kan inverka på gasproduktionen.

2 Litteraturgenomgång

2.1 Kolhydrater i betesgräs

Kolhydrater är uppbyggda av kemiska komponenter som innehåller grundämnen kol, väte och syre (McDonald *et al.*, 2011). Gräs består till största delen av kolhydrater, och dessa kan delas in i strukturella och icke-strukturella (McDonald *et al.*, 2011). Den huvudsakliga kolhydratfraktionen i gräs utgörs av de strukturella kolhydraterna som även kallas fibrer. De smältbara fiberfraktionerna cellulosa, hemicellulosa och pektin bildar tillsammans med lignin cellväggen hos växter. Lignin ger växten strukturellt stöd under tillväxt och tillhör gruppen icke smältbara fibrer (McDonald *et al.*, 2011). Innehållet och smältbarheten av de strukturella kolhydraterna i betesgräs avgör i stor utsträckning betets energiinnehåll (Harris *et al.*, 2009).

De icke-strukturella kolhydraterna (non structural carbohydrates, NSC) finns i cellinnehållet och utgörs av både stärkelse och WSC (water soluble carbohydrates) (McDonald *et al.*, 2011). I WSC-fraktionen ingår glukos och fruktos som är monosackarider tillsammans med sukros som är en disackarid bestående av glukos och fruktos, samt fruktan som är en polysackarid bestående av kedjor av fruktos med en sukrosmolekyl i ena änden. Dessa kedjor är sammanlänkade med β -2,1- eller β -2,6-bindningar och kallas inulin respektive levan (McDonald *et al.*, 2011). Kedjelängden (som även kallas polymeriseringsgrad) på fruktan i växter varierar från cirka tio upp till flera hundra fruktosenheter (Ritsema & Smeekens, 2003). Inulin har en lägre polymeriseringsgrad än levan som är den mest förekommande fruktantypen i tempererade gräsarter (Nelson & Spollen, 1987).

Beroende på hur växten fixerar kol genom sin fotosyntes kan de betecknas som C3 (gräsarter i tempererade klimat) eller C4 (gräsarter i tropiska klimat) (Ehleringer & Cerling, 2002). Genom fotosyntesen bildar växten socker som transporteras och används i olika metaboliska processer, och vid överskott lagras dessa istället som energireserv (Patrick *et al.*, 2013; Ritsema & Smeekens, 2003). Hos C3 gräs som är adapterade till kallare klimat sker denna lagring i växtens vegetativa vävnad i form

av fruktaner i grässets stjälk (McDonald *et al.*, 2011). Denna inlagring är en viktig energireserv för bland annat vinterhärdighet, under övervintringen samt för återväxten (Smith, 1972). Gräs som tillhör släktet timotej (*Phleum spp.*), flen (*Phalaris spp.*) och losta (*Bromus spp.*) är mer vinterhärdiga än hundäxing (*Dactylis spp.*), svingel (*Festuca spp.*) och rajgräs (*Lolium spp.*) (Suzuki, 1989). Det finns dock inget linjärt samband mellan grässets vinterhärdighet och WSC-koncentrationen (Suzuki, 1989). Hos C4 gräs som är mer anpassade till tropiska klimat sker istället energiinlagringen som stärkelse i växtens blad (McDonald *et al.*, 2011).

2.2 Faktorer som inverkar på halten kolhydrater och dess smältbarhet i betesgräs

2.2.1 Gräsart

Växtens genotyp, vilket inkluderar både art och sort, är en av många faktorer som inverkar på halten kolhydrater och näringsinnehåll (Kagan *et al.*, 2019; Jensen *et al.*, 2014; Čop *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2008). Under betessäsongen kan olika gräsarter variera i sin kemiska sammansättning (Čop *et al.*, 2009; Thorvaldsson *et al.*, 2007). Skillnader i halten NSC mellan arter är större än mellan olika sorter inom samma art (Zhao *et al.*, 2008). Engelskt rajgräs och hundäxing är exempel på gräsarter som generellt har en hög respektive låg koncentration av WSC (Jensen *et al.*, 2014; McDonald *et al.*, 2011). Hos vissa rajgräs har WSC-innehållet påvisats kunna vara upp till 300 g/kg ts och hos tropiska arter så låg som 25 g/kg ts (McDonald *et al.*, 2011). Foderlostas har även påvisats ha högre koncentration av NSC jämfört med rörsvingel, rörsvingelhybrid (som är en korsning mellan italienskt rajgräs och rörsvingel), samt två olika arter av perenna vetegräs (Zhao *et al.*, 2008). Olika gräsarter har även påvisats skilja sig åt i koncentration av neutral detergent fiber (NDF) vid samma skördetidpunkt under flera skördetillfällen där engelskt rajgräs haft lägst innehåll följt av ängssvingel, ängskavle, rödsvingel, ängsgröe och timotej i stigande ordning (Thorvaldsson *et al.*, 2007).

2.2.2 Botaniskt utvecklingsstadium

Betesgräs är i ett dynamiskt tillstånd där förhållandet mellan blad och stjälk samt cellvägg och cellinnehåll förändras över tid eftersom det betas av och återväxer repetitivt (McDonald *et al.*, 2011). Grässets botaniska utvecklingsstadium är därmed en viktig faktor som påverkar både den kemiska sammansättningen och näringsvärdet (McDonald *et al.*, 2011).

Innehållet av glukos, fruktos och sukros är generellt som högst i ett tidigt botaniskt utvecklingsstadium och minskar med ökad plantmognad, medan innehållet av fruktan generellt ökar i takt med växtens plantmognad (Chatterton *et al.*, 2006; Shewmaker *et al.*, 2006). Detta eftersom ett senare botaniskt utvecklingsstadium leder till att andelen stjälk hos gräset blir allt mer dominerande och fruktan lagras framför allt i stjälken (Shewmaker *et al.*, 2006). Betesgräs i ett tidigt utvecklingsstadium har en högre andel blad än stjälk och andelen blad i proportion till stjälken minskar med ökad plantmognad (McDonald *et al.*, 2011).

Neutral detergent fiber utgörs främst av cellulosa, hemicellulosa samt lignin och koncentrationen ökar med gräsets vegetativa utveckling samtidigt som smältbarheten minskar, vilket främst beror på andelen lignifierad vävnad som ökar (Särkijärvi *et al.*, 2012b; McDonald *et al.*, 2011). Det finns skillnader mellan koncentrationen av NDF samt med vilken hastighet innehållet ökar i takt med tilltagande plantmognad hos olika gräsarter (Thorvaldsson *et al.*, 2007). Innehållet av råprotein följer istället ett omvänt mönster och minskar med ökat botaniskt utvecklingsstadium (Ersahince & Kara, 2017; Chatterton *et al.*, 2006). Gräsprover skördade i ett tidigt botaniskt utvecklingsstadium har en snabb nedbrytningshastighet och en högre total gasproduktion *in vitro* med hästräck som inokulant, som minskar med ökad plantmognad (Ersahince & Kara, 2017).

2.2.3 Klimat

Den näringsmässiga kvaliteten på betesgräset och i vilken hastighet dess smältbarhet förändras påverkas av en rad olika externa miljöfaktorer som temperatur, ljusintensitet samt vattentillgång (Virkajärvi *et al.*, 2012; Steward & Hayes, 2011; Thorvaldsson *et al.*, 2007). Koncentrationen av WSC varierar dessutom över både dygnet (Bowden *et al.*, 1968) och under året (Williams *et al.*, 2019; Waite & Boyd, 1953).

Temperaturen har en stor inverkan på den näringsmässiga kvaliteten eftersom en hög temperatur leder till att en ökad proportion av fotosyntesens slutprodukter går till bildandet av strukturella komponenter (Dewar, 2000). En ökad temperatur främjar ackumuleringen av alla fiberfraktioner i tempererat gräs som tillsammans med minskad andel blad och ökad andel stjälk samt lignifiering leder till att smältbarheten av torrsubstansen minskar (McDonald *et al.*, 2011; Thorvaldsson *et al.*, 2007). En ökad temperatur har påvisats ge högst ökning av NDF-innehållet hos ängssvingel, timotej och engelskt rajgräs i jämförelse med ängskavle, rödsvingel och ängsgröe (Thorvaldsson *et al.*, 2007). Respirationen är den process där de kolhydrater som producerats under dagen genom fotosyntesen förbränns, vilket sker i varierad hastighet beroende på den omgivande temperaturen (Atkin & Tjoelker, 2003; Murata & Iyama, 1963). Om temperaturen under natten överstiger 5° C kommer det socker som producerats under dagen att utnyttjas genom respiration (Atkin &

Tjoelker, 2003). Detta medför att koncentrationen av WSC kommer vara som lägst tidigt under morgonen, för att öka fram till eftermiddagen där den når sin maximala koncentration, för att sedan sjunka igen under natten (Kagan *et al.*, 2019; Ciavarella *et al.*, 2000).

Innehållet av WSC varierar även över betessäsongen och högst halt har påvisats tidigt på våren (Kagan *et al.*, 2011) och under hösten (Rivero *et al.*, 2019), när den omgivande temperaturen minskar både tillväxt och respiration hos växten (Murata & Iyama, 1963). Förändringen av rp-halten över betessäsongen följer samma mönster där den högsta koncentrationen uppmätts under tidig vår och höst (Rivero *et al.*, 2019; Särkijärvi *et al.*, 2012b). Tempererat gräs har förmåga att till viss del förändra sin metabolism för att klara av kallare temperaturer, vilket delvis sker genom att växten omfördelar substrat som bland annat WSC för att förhindra att dess celler skadas (Atkin & Tjoelker, 2003). För att upprätthålla denna tolerans kommer även olika gener att komma till uttryck som vidare leder till ökad tolerans mot den kallare temperaturen (Zhu *et al.*, 2007). Halten WSC och fruktan som ackumuleras vid kallare temperaturer är associerad med vinteröverlevnad hos växter (Sanada *et al.*, 2007).

Antalet soltimmar under dygnet påverkar koncentrationen av WSC i gräs (Mackenzie & Wylam, 1957). Gräs som utsätts för fler soltimmar kan därmed ackumulera en högre mängd WSC än om det varit mer molnigt under dygnet (Rücker, 1990). Detta har även påvisats i fältförsök där beteshagar i skugga haft en lägre koncentration WSC i jämförelse med oskuggade beteshagar, men redan efter två till fyra timmar efter att det skuggade gräset fått tillgång till solljus har koncentrationen ökat till densamma som för det oskuggade gräset (Ciavarella *et al.*, 2000).

Vid perioder av torra kan det totala innehållet av WSC fördubblas, vilket däremot konsumeras relativt snabbt av växten för att överleva (Thomas & James, 1999). Fruktan har en särskilt viktig roll och ger gräset en viss tolerans att klara torrare perioder genom att fruktan ackumuleras (Voltaire & Lelièvre, 1997). Detta möjliggör tillväxt när vatten återigen blir tillgängligt (Thomas & James, 1999).

2.2.4 Gödsling

Att gödsla bete med kväve (N) kan i viss utsträckning förlänga betessäsongen (Thomet *et al.*, 2008). Detta eftersom det ger en ökad torrsustansavkastning, vilket främst sker i de delar av gräset som överstiger 4–5 cm (Wilman, 1980). Det finns även skillnader mellan olika gräsarters respons på tillförsel av N där rajgräs generellt ger en högre avkastning per kg tillförd N än arter av svinglar. Genom att tillföra N sker även en viss förändring av den kemiska sammansättningen i gräset genom bland annat en minskad koncentration WSC. Halten av WSC är negativt korrelerat med råproteinhalten, vilket medför att ökad applicering av N ger ökat innehåll av

råprotein på bekostnad av WSC i betesgräset (Tas *et al.*, 2006; Delagarde *et al.*, 2000).

En högre applicering av N har påvisats ge såväl oförändrad, minskad som ökad smältbarhet av organisk substans jämfört med både lägre tillförsel av N samt ogödslade beteshagar (Lovett *et al.*, 2004; Cone *et al.*, 1998; Blaser, 1964). Dessutom har betesgräs som fått en högre N-giva än ogödslat bete och lägre nivåer av N gett en minskad total gasproduktion *in vitro* med vomvätska som inokulant (Lovett *et al.*, 2004; Cone *et al.*, 1998).

2.2.5 Avbetning

Grässets förmåga att återväxa efter avbetning är en viktig mekanism för växtens överlevnad och är möjlig bland annat på grund av dess energireserver (Smith, 1972) och kompensatorisk tillväxt genom att utnyttja lagrad tillväxtkapacitet (McNaughton, 1983). Avbetningen påverkar gräset direkt genom avbladning som medför att blad som används för fotosyntesen försvinner, vilket påverkar innehållet av WSC (Donaghy & Fulkerson, 1997). Detta medför att växten måste mobilisera och utnyttja sina energireserver för att kunna bilda nya skott, vilket leder till att WSC halten i gräset minskar. När växten har återfått tillräckligt med blad för att kunna återfå sin fotosyntetiska kapacitet kommer innehållet av WSC åter att öka (Donaghy & Fulkerson, 1997). Under den första veckan efter avbetning kommer cirka en tredjedel av återväxten från grässets energireserv och resterande genom fotosyntes (Donaghy & Fulkerson, 1997).

Avbetningen kan påverka innehållet av sukros och fruktan i betesgräset nästkommande säsong om den varit intensiv (Benot *et al.*, 2018). Intensiteten under det innevarande året påverkar dock inte halten glukos, fruktos, sukros eller fruktan (Benot *et al.*, 2018). Hästar är selektiva och föredrar generellt betesgräs med ett högt innehåll av NSC som har en hög smaklighet (Allen *et al.*, 2013; Longland & Byrd, 2006; Fleurance *et al.*, 2001).

2.3 Hästens digestion av kolhydrater

Beroende på hur de olika kolhydraterna bryts ner i hästens digestionskanal kan de delas in i hydrolyserbara och fermenterbara kolhydrater (Hoffman *et al.*, 2001; Frape, 2010). De hydrolyserbara kolhydraterna bryts ned av kroppsegna enzymer och de fermenterbara jäses av mikroorganismer till flyktiga fettsyror i hästens grovtarm (Frape, 2010). Strukturella kolhydrater tillhör främst gruppen fermenterbara (Frape, 2010) och icke-strukturella kolhydrater kan vara både hydrolyserbara och fermenterbara (Hoffman *et al.*, 2001). Hydrolyserbara kolhydrater finns i betesgräs

även om de främst förekommer i en betydligt större utsträckning i spannmål (Hoffman *et al.*, 2001).

2.3.1 Hydrolyys

De enkla sockerarterna glukos och fruktos absorberas i princip som de är samtidigt som hydrolyserbara kolhydrater som sukros och stärkelse bryts ner enzymatiskt innan de kan absorberas som glukos och fruktos i tunntarmen (Frape, 2010; Hoffman, 2009). I tunntarmen utsöndras sukras som spjälkar sukros och α -amylas som bryter ner stärkelse till dextriner som vidare spjälkas av α -glukosidas (glukoamylas, maltas och isomaltas) (Frape, 2010; Hoffman, 2009). Hästens saliv saknar i princip enzymatisk aktivitet, vilket medför att det knappt sker någon hydrolyys före magsäcken där magsaften hydrolyserar kolhydrater i begränsad utsträckning (Frape, 2010; Hoffman, 2009). I tunntarmen initieras nedbrytningen av kolhydrater främst av α -amylas från bukspottkörteln (Hoffman, 2009). Slutprodukterna från hydrolysen är de fria sockerarterna glukos och fruktos (Frape, 2010; Hoffman, 2009). Hydrolyys av stärkelse och kolhydrater är generellt metaboliskt effektivare än den mikrobiella fermentationen av fiber (Hoffman, 2009).

2.3.2 Fermentation

Till fermenterbara kolhydrater hör bland annat smältbara fiber (pektin, hemicellulosa och cellulosa), resistent stärkelse som inte kan brytas ned av enzymer i hästens digestionskanal och eventuellt fruktaner (Hoffman, 2009). Hur fruktaner bryts ner i hästens digestionskanal är inte klarlagt, men de antas passera till grovtarmen där mikrobiell fermentation av dem sker (Longland *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2001). Det finns inga kända endogena enzym för nedbrytning av fruktaner hos häst (Bachmann *et al.*, 2019), men en viss mängd fruktaner verkar kunna brytas ned till viss del genom sur hydrolyys i magsäcken eller mikrobiell nedbrytning före grovtarmen (Bachmann *et al.*, 2019; Coenen *et al.*, 2006).

De kolhydrater som inte bryts ned i tunntarmen passerar vidare till grovtarmen där mikroorganismerna fermenterar dem, vilket leder till produktion av acetat, propionat, butyrat och valerat som tillsammans kallas för flyktiga fettsyror (volatile fatty acids, VFA) samt en liten mängd laktat (Frape, 2010). De flyktiga fettsyrorerna är den allra främsta energikällan för hästen och för att gynna upptaget av VFA samt miljön för mikroberna bör pH i grovtarmen vara runt 6,5 (Frape, 2010). Genomsnittligt pH i grovtarmen hos hästar på bete har uppmätts till 6,7 (Mackie & Wilkins, 1988).

De olika kolhydraterna kan fermenteras i varierad hastighet samtidigt som proportionerna av VFA som produceras även kan skilja åt (Hoffman *et al.*, 2001).

Olösliga fibrer som cellulosa och hemicellulosa tar längst tid att fermentera (Hoffman *et al.*, 2001) och vid fermentationen av dessa bildas främst acetat och butyrat (Frape, 2010). De kolhydrater som fermenteras snabbast är hydrolyserbara kolhydrater som resistent stärkelse och fruktaner som inte hunnit brytas ned i tunntarmen (Hoffman, 2009; Hoffman *et al.*, 2001). Dessa snabbt fermenterbara kolhydrater kan ge ökad produktion av laktat vilket leder till ett sänkt pH (Hoffman, 2009; Frape, 2010). En sur miljö i grovtarmen gynnar de laktatproducerande bakterierna vilket ger ytterligare ökad laktatproduktion och därmed en ytterligare sänkning av pH, vilket kan resultera i grovtarmsacidosis som kan leda till utveckling av fång (Ince *et al.*, 2014; Al Jassim *et al.*, 2005).

Under den mikrobiella fermentationen i grovtarmen bildas även en stor mängd gas i form av koldioxid, metangas och en mindre mängd vätgas (Frape, 2010; Al Jassim & Andrews, 2009). Om större mängd gas bildas än vad som kan eller hinner absorberas, kan gasen ansamlas och hästen drabbas av gaskolik, vilket är ett mycket allvarligt och smärtsamt tillstånd (Frape, 2010). Kolik är den tredje vanligaste dödsorsaken hos häst (Egenvall *et al.*, 2009). Kolik kan bland annat uppstå vid utfodring med för hög mängd lättlösliga kolhydrater som har en snabb fermentationshastighet (Frape, 2010). Ett högt innehåll av fruktan ger en snabb fermentering och en hög total gasproduktion *in vitro* (Ince *et al.*, 2014). Fruktaner som har en låg polymeriseringsgrad fermenteras snabbare *in vitro* än de som har en längre kedjelängd (Ince *et al.*, 2014).

2.3.3 Mikroflora

Den mikrobiella populationen i hästens digestionskanal är komplex och skiljer sig åt mellan olika delar av digestionskanalen och även mellan individer (Salem *et al.*, 2018; Grimm *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2015). Den mikrobiella sammansättningen och aktiviteten i olika delar av digestionskanalen och träcken kan påverkas av olika faktorer som bland annat utfodring med foder med högt innehåll av fiber eller stärkelse (Grimm *et al.*, 2017). Den mikrobiella sammansättningen i träck kan till viss del förändras under betessäsongen (Salem *et al.*, 2018) och plötsliga intag av höga mängder fruktaner kan leda till obalans i hästens mikrobiota (Al Jassim & Andrews, 2009). Detta eftersom höga halter fruktan gynnar miljön för laktatproducerande bakterier i grovtarmen som därmed ökar i antal samtidigt som andelen cellulolytiska bakterier minskar (Al Jassim & Andrews, 2009). Den mikrobiella populationen i hästens träck skiljer sig inte i någon större utsträckning från mikrosammansättningen i stora kolon (Costa *et al.*, 2015), men skillnader i mikrobiotan har påvisats bland annat mellan träck och cecum (Dougal *et al.*, 2012).

2.4 Olika metoder att mäta smältbarhet i fodermedel till häst

Nedbrytningen av olika fodermedel hos häst kan skattas genom olika metoder (Martin-Rosset *et al.*, 2012). *In vivo* metoder används ofta för att utvärdera olika fodermedel till häst med avseende på smältbarhet av organisk substans (Särkijärvi *et al.*, 2012a). Detta kan göras genom studier med bland annat markörer (Miraglia *et al.*, 1999) eller totaluppsamling av träck och urin (Särkijärvi *et al.*, 2012a; Udén & Van Soest, 1982). Det kan även genomföras med *in situ* teknik där nylonpåsar placeras i fistulerade hästars blindtarm (Udén & Van Soest, 1984), eller med mobila nylonpåsar innehållande foderprov som sondas ned i magsäcken och sedan fångas upp via en caecumfistel eller i träcken (Philippeau *et al.*, 2014). *In vivo* metoder ger realistiska och noggranna värden samtidigt som de är både tidskrävande och dyra och kräver tillgång till försökshästar (Martin-Rosset *et al.*, 2012; Särkijärvi *et al.*, 2012a). Detta är en av anledningarna till att mer laborativa metoder har utvecklats för att kunna skatta nedbrytningen av olika fodermedel till häst (Martin-Rosset *et al.*, 2012). Därmed har *in vitro*-tekniker med mätning av gasproduktion utvecklats. Till en början användes vätska från hästens blindtarm som inokulant (Macheboeuf *et al.*, 1998), men denna metod kräver fistulerade hästar (Santos *et al.*, 2012). Det är dock möjligt att använda färsk hästräck som alternativ inokulant (Murray *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2009). Målet med *in vitro* metoder är att skatta *in vivo*-digestion genom att efterlikna fysiologiska förhållanden som pH, temperatur och inkubationstid (Coles *et al.*, 2005).

In vitro-metoder möjliggör att fler foderprover, men även olika typer av tillsatser, kan testas både snabbare samt till en minskad kostnad och utan att behöva använda hästar i försök (Murray *et al.*, 2005). Mängden gas som produceras kan även användas för att skatta smältbarheten av organisk substans, då en stark korrelation mellan smältbarhet av organisk substans *in vivo* och gasproduktion *in vitro* efter 24 timmars inkubering har påvisats med vätska från hästens blindtarm som inokulant (Macheboeuf *et al.*, 1997). En begränsande faktor i *in vitro* metoder är att mikroorganismerna behöver konstant tillförsel av näringsämnen för att bibehålla sin fermentativa aktivitet, vilket kan påverka nedbrytningspotentialen (Franz *et al.*, 2018).

2.4.1 Mätning av gasvolym vid *in vitro*-fermentation

Gasproduktionsmetoden har historiskt utvecklats för att utvärdera fodermedel för idisslare (Menke *et al.*, 1979), men den har även använts för samma ändamål för häst (Murray *et al.*, 2014; Murray *et al.*, 2009). För att studera den mikrobiella nedbrytningen av ett fodermedel genom att mäta ackumulerad gasvolym kan färsk träck

användas som inokulant (Santos *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2009). Liknande gasproduktion har uppmätts då vätska från cecum och träck använts som inokulanter, men vätska från colon som inokulant har visat lägre gasproduktion i jämförelse med träck (Murray *et al.*, 2014). Det saknas dock standardiserade tillvägagångssätt för användning av hästträck som inokulant, vilket medför svårigheter att kunna jämföra resultaten mellan olika studier (Franz *et al.*, 2018). Den mikrobiella sammansättningen och aktiviteten i träcken kan påverkas av utfodringen av donatordjuren (Murray *et al.*, 2009; Rymer *et al.*, 2005).

När fodermedel inkuberas *in vitro* fermenteras kolhydrater främst till VFA samt gaser (Blümmel & Ørskov, 1993). Den mängd gas som bildas vid inkubering kan fungera som en indikator på den mikrobiella aktiviteten (Elghandour *et al.*, 2018). Gasen kommer dels direkt i form av koldioxid och metan som ett resultat av fermentationen av substratet, men även indirekt genom buffring av VFA som neutraliserar vätskan och leder till att koldioxid frigörs från buffertlösningen (Blümmel & Ørskov, 1993).

Beroende på vilken typ av substrat som inkuberas kan skillnader uppstå i proportionen av de olika syrorna samt i gasproduktionen (Blümmel & Ørskov, 1993). Lättlösliga kolhydrater genererar generellt en högre proportion av propionat (Beuving & Spoelstra, 1992) samtidigt som strukturella kolhydrater som fermenteras långsammare istället genererar mer acetat (Blümmel & Ørskov, 1993). Den totala gasproduktionen påverkas därmed av slutprodukterna från fermentationen (Beuving & Spoelstra, 1992). Större total gasvolym och högre produktionshastighet av gas har uppmätts för kraftfoder som innehåller en högre andel snabbt fermenterbara beståndsdelar jämfört med grovfoder (Elghandour *et al.*, 2016). Detta resulterade även i ett lägre pH värde efter inkubering för kraftfodermedlen, som kan förklaras av en högre koncentration av laktat i jämförelse med då grovfoder inkuberats (Elghandour *et al.*, 2016).

Förbehandling av foderprover är en viktig faktor vid *in vitro* inkubation. Proverna torkas och mals för att bli mer homogena och lätthanterade (Murray *et al.*, 2010; Lowman *et al.*, 2002). En negativ aspekt med detta är att substratet inte fullständigt efterliknar det hästen primärt utfodras med. Malningen har dock inte påvisats inverka på den totala gasproduktionen i jämförelse med omalda foderprover (Murray *et al.*, 2010). I andra studier av partikelstorlekens inverkan har högre gasproduktion påvisats för foderprover som malts till 0,6–0,15 mm i jämförelse med 2,4–1,2 mm (Lowman *et al.*, 2002). Fermentationshastigheten har också visats vara högre hos malda foderprover med en mindre partikelstorlek jämfört med omalda och malda foderprover med större partikelstorlek (Murray *et al.*, 2010; Lowman *et al.*, 2002). Förtorkade foderprover har påvisats ge en högre total gasproduktion än färsk foderprover som inkuberas direkt utan föregående torkning (Calabrò *et al.*, 2005; Lowman *et al.*, 2002). En förklaring till detta kan vara att förtorkningen till

viss del förändrar strukturen på växtcellerna som medför att mikroorganismerna lättare kan fästa på substratet och därmed ge ökad nedbrytning (Lowman *et al.*, 2002). Efter avslutad inkubering har färskare prover i jämförelse med förtorkade påvisats ha ett högre pH-värde (Calabrò *et al.*, 2005; Lowman *et al.*, 2002).

De substrat som inkuberas kan innehålla fraktioner som normalt inte når hästens grovtarm, vilket har medfört att fodermedel förbehandlats innan inkubering för att simulera enzymatisk nedbrytning före grovtarmen (Abdouli & Attia, 2007). Enzymatisk förbehandling är dock inte nödvändig och påverkar inte gasproduktionen i någon större utsträckning för fiberrika fodermedel som gräsprover. Däremot kan det vara nödvändigt för fodermedel som istället har ett högt innehåll av bland annat protein eller stärkelse (Abdouli & Attia, 2007).

3 Material och metod

3.1 Gräsprover

I detta försök användes sex olika gräsarter som odlades i renbestånd på Vollebekk försöksgård som tillhör Norges miljö- och biovetenskapliga universitet. De gräsarter som användes var engelskt rajgräs (*Lolium perenne*), foderlost (Bromus inermis), hundäxing (*Dactylis glomerata*), rörsvingel (*Festuca arundinacea*), timotej (*Phleum pratense*) och ängssvingel (*Festuca pratensis*). Samtliga gräsarter såddes in i försöksrutor i slutet av maj under år 2018 i ett randomiserat blockförsök med tre parceller per art. Samtliga gräsarter gödslades med 100 kg N/ha (22-3-10, % NPK) under våren 2019. De olika försöksrutorna skördades under 2019 vid fyra olika tidpunkter med stubb höjd på 3–4 cm för att efterlikna hästbete på återväxt efter en första skörd. De fyra olika simulerade avbetningstidpunkterna var 3 juli, 1 augusti, 2 september samt 29 oktober.

3.2 Kemisk sammansättning

Torrsubstanshalten bestämdes genom att torka betesproverna i två steg. Först torkades proverna i 55°C under 18 timmar innan de vägdes och maldes. Därefter torkades proverna igen i 103°C under 20 timmar. Koncentrationen av råprotein bestämdes genom analys av totala kvävekoncentrationen enligt Kjeldahl multiplicerat med faktorn 6,25 (Bremner & Breitenbeck, 1983). Innehållet av ADF och NDF analyserades enligt Van Soest, Robertson & Lewis (1991) med förändringar som beskrivs av Chai & Udén (1998). Därefter skickades betesproverna till Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) där halten fri glukos, fri fruktos, sukros och fruktan analyserades vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård med enzymatisk-spektrofotometrisk metod enligt Larsson & Bengtsson (1983). Dessa fraktioner summerades sedan för innehållet av total WSC.

På grund av bristande provmängd för några av arterna slogs prov från de tre parcellerna inom samma art och skördetillfälle ihop till ett samlingsprov för att provmängden skulle räcka till för *in vitro*-körningarna.



Figur 1. Fotografi över en andel av parcellerna på Vollebekk försöksgård, Norge i slutet av augusti 2019. (Foto: Cecilia Müller, SLU).

3.3 Gasmätningar *in vitro*

Gräsproverna inkuberades i ett *in vitro*-system med gasflödesmätare (Gas Endeavour, Bioprocess Control AB, Lund, Sverige) där totalt 15 prover kunde inkuberas per omgång. Gasflödesapparaturen var försedd med flödescellsenheter som mätte individuellt gasflöde från varje inkubationsenhet, vilket skedde när 2 ml gas ackumulerats. Både den ackumulerade gasvolymen samt gasflödeshastigheten per tidsenhet registrerades i en processor som normaliserade mätvärden (N) (1,0 standard atmosfäriskt tryck, 0°C och inget fuktinnehåll).

Under varje omgång inkuberades 12 gräsprover och två kontrollprover med låg (halm) respektive hög (sukros) smältbarhet samt en blank (som endast innehöll buffert och inokulant) i förslutbara 500 ml glasflaskor. Alla glasflaskor var försedda med omrörare som under hela inkuberingen roterade med ett förinställt intervall, med undantag för två glasflaskor där omrörarna inte fungerade hela tiden under en

av körningarna. Under varje intervall roterade omrörarna under 60 sekunder med en hastighet av 40 varv/minut och var därefter stilla under 60 sekunder innan riktningen omvändes. Totalt analyserades 59 gräsprover. Alla gräsprover utom foderlösta från det fjärde skördetillfället inkuberades i duplikat, vilket berodde på en för liten mängd prov som endast räckte till en körning.

3.4 Insamling av *faeces* samt inkubering

Dagen före inkuberingen förbereddes 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 samt var under omrörning över natt. Cirka en timme före inkubation tillsattes 8,50 g $NaHCO_3$ till bufferten. Under samma dag som inkuberingen startades vägdes 4 g gräsprover samt kontrollprover in i glasflaskorna som placerades i 38°C vattenbad. När alla proverna var förberedda samlades färsk träck in från två slumpmässigt utvalda hästar ur en och samma besättning (undervisningshästar vid Inst. för kliniska vetenskaper, SLU). Hästarna utfodrades med en grovfoderbaserad foderstat bestående av hösilage med en torrsubstanshalt på 67,2 % och som innehöll 8,2 MJ omsättbar energi och 53 g smältbart råprotein/kg ts.

Träcken från donatorhästarna samlades in direkt vid defekering i sterila stomacher påsar som förslöts direkt i samband med insamling för att bibehålla en så anaerob miljö som möjligt och placerades i isolerväska med varmvattenflaskor för att inte kylas av. Därefter blandades 200 g träck från vardera häst tillsammans med 2 l buffert under tillförsel av CO_2 och kördes i en Stomacher under 30 sekunder på låg hastighet för att homogenisera träcken. Blandningen silades genom ett såll med en maskstorlek på 2 mm för att avskilja de största partiklarna. Därefter placerades blandningen i ett 38°C vattenbad med tillförsel av CO_2 . Sedan tillsattes 300 ml buffert i respektive glasflaska med invägda prov under tillförsel av CO_2 . Därefter tillsattes 100 ml av träckblandningen i inkuberingsflaskorna, flaskorna förslöts, omrörarna startades och mätningarna sattes igång, vilka pågick i totalt 24 timmar. Efter varje körning laddades data för ackumulerad gasvolym och gasproduktion per tidsenhet ned i Excelfiler. Kurvanpassning för de uppmätta värdena för gasproduktionen har ej genomförts.

3.5 pH-mätningar

Direkt efter avslutad 24 timmars inkubering mättes pH-värdet i samtliga inkubationsflaskor med en pH-meter (VWR pHenomenal® pH 1100 H, VWR International AB, Stockholm, Sverige).

3.6 Statistiska analyser

Analysresultat från kemisk sammansättning, gasproduktion, fermentationshastighet samt pH sammanställdes i Microsoft Excel. Data från analys av den kemiska sammansättningen för betesproverna bearbetades statistiskt med hjälp av Statistical Analysis System (SAS) (Version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Variansanalys (två-vägs ANOVA) genomfördes med art och avbetningstidpunkt som fixa faktorer och interaktionseffekter mellan art och avbetningstidpunkt undersöktes. Skillnader där $P < 0,05$ ansågs vara statistiskt skilda åt. Parvisa jämförelser gjordes enligt Tukey-Kramer metoden.

Korrelationsanalys genomfördes även med hjälp av SAS. Pearson korrelationskoefficienter beräknades för samband mellan kemisk sammansättning (inklusive pH) och ackumulerad gasvolym vid 6, 12 och 24 h. Korrelationer med $P < 0,05$ ansågs vara statistiskt säkerställda.

4 Resultat

4.1 Kemisk sammansättning

Effekt av gräsart och avbetningstidpunkt på kemisk sammansättning i betesproverna presenteras i tabell 1. Det fanns interaktionseffekter mellan gräsart och avbetningstidpunkt för ts, aska, NDF, ADF, rp, fri glukos, sukros, fruktan samt total WSC men inte för fri fruktos (tabell 1). Artskillnader för olika variabler redovisas därför inom respektive avbetningstidpunkt.

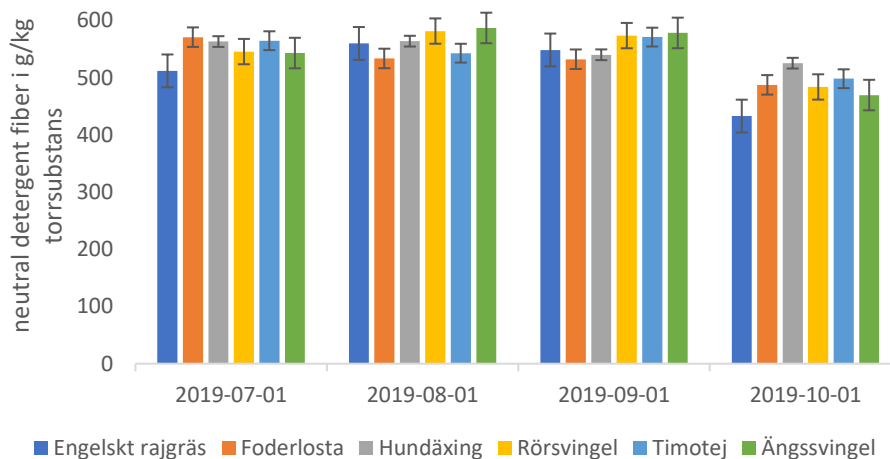
Tabell 1. Effekt av art och avbetningstidpunkt på genomsnittlig kemisk sammansättning i betesprover. Prover har tagits vid upprepade tillfällen (avbetningstidpunkt) från samma parceller. NDF, neutral detergent fiber, ADF, acid detergent fiber (ADF), WSC, lättlösliga kolhydrater. Presenteras i g/kg ts om inget annat anges

Gräsart	Avbetningstidpunkt	Torrsubstans, g/kg	Aska	NDF	ADF	Råprotein	Fri glukos	Fri fruktos	Sukros	Fruktan	Total WSC
Engelskt rajgräs	2019-07-03	360	101	512	279	72	32	44	18	99	193
Foderlost	2019-07-03	357	106	571	333	87	33	36	15	27	112
Hundäxing	2019-07-03	344	93	563	308	64	26	37	16	83	161
Rörsvingel	2019-07-03	332	101	546	290	61	30	46	23	107	207
Timotej	2019-07-03	369	87	565	311	76	32	44	9	59	144
Ängssvingel	2019-07-03	378	89	543	289	72	25	39	16	100	181
Engelskt rajgräs	2019-08-01	372	132	560	296	104	27	32	9	33	101
Foderlost	2019-08-01	410	113	534	284	129	25	24	16	18	84
Hundäxing	2019-08-01	351	135	564	305	104	17	21	8	27	73
Rörsvingel	2019-08-01	322	124	581	293	103	27	33	12	34	107
Timotej	2019-08-01	438	94	543	267	96	29	31	8	52	120
Ängssvingel	2019-08-01	407	112	587	290	113	24	28	8	31	91
Engelskt rajgräs	2019-09-02	402	126	548	293	121	23	23	35	18	99
Foderlost	2019-09-02	435	122	532	286	136	18	13	49	15	96
Hundäxing	2019-09-02	364	152	540	296	118	10	11	40	23	83
Rörsvingel	2019-09-02	349	119	574	287	123	23	23	53	19	118
Timotej	2019-09-02	442	112	571	286	122	25	22	46	21	114
Ängssvingel	2019-09-02	426	112	578	283	123	20	21	39	23	103

Gräsart	Avbetningstidpunkt	Torrsubstans, g/kg	Aska	NDF	ADF	Råprotein	Fri glukos	Fri fruktos	Sukros	Fruktan	Total WSC
Engelskt rajgräs	2019-10-29	376	143	433	227	129	79	95	34	95	304
Foderlosta	2019-10-29	603	133	487	243	176	70	65	38	32	205
Hundäxing	2019-10-29	580	189	525	276	146	49	51	32	15	147
Rörsvingel	2019-10-29	424	191	484	252	135	70	77	28	44	220
Timotej	2019-10-29	442	199	498	254	126	63	67	18	49	197
Ängssvingel	2019-10-29	431	161	470	241	138	73	79	21	38	211
Signifikansnivå											
Avbetningstidpunkt		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Art		***	NS	**	NS	***	***	***	**	***	***
Avbetningstidpunkt x art		***	*	***	**	***	*	NS	**	***	***

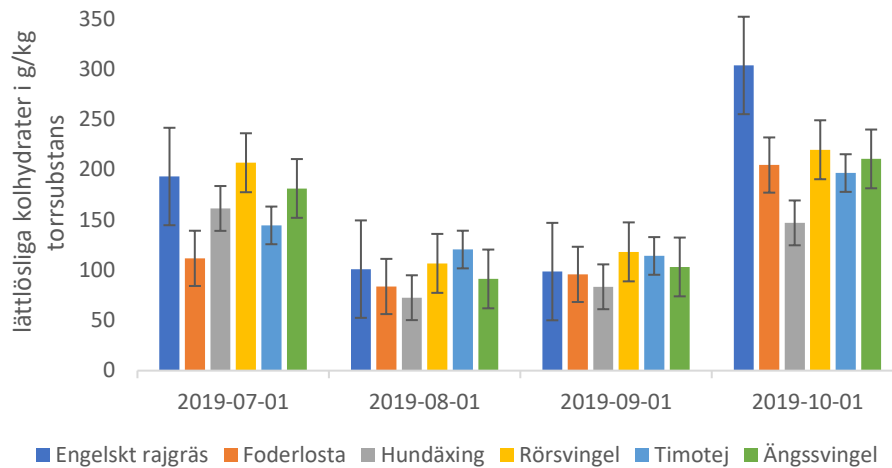
NS, ej signifikant; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$

Avbetningstidpunkten påverkade inte NDF-innehållet på samma sätt för alla gräsarter, då foderlosta och hundäxing hade samma innehåll av NDF oavsett avbetningstidpunkt. Tidpunkten för avbetning hade mer varierande inverkan på NDF-innehållet för de övriga gräsarterna (figur 2).



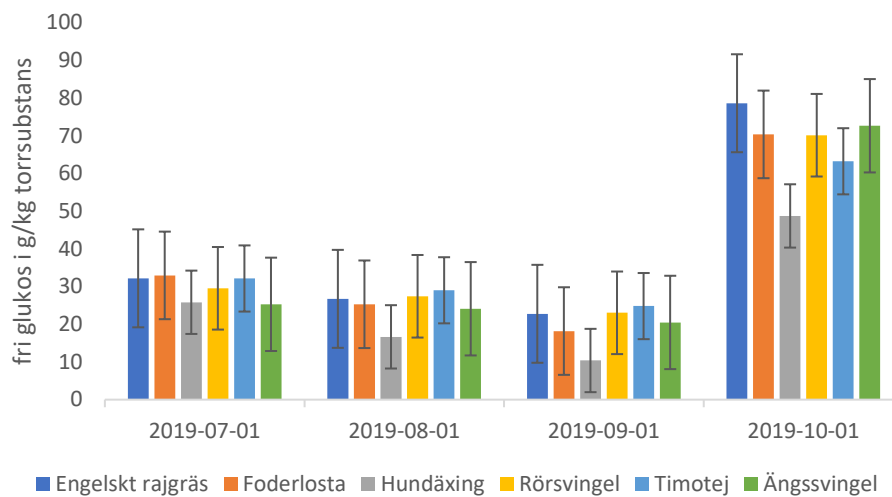
Figur 2. Genomsnittligt innehåll av neutral detergent fiber i olika gräsarter provtagna vid olika avbetningstidpunkter. Vid den första avbetningstidpunkten skiljde sig foderlosta och engelskt rajgräs åt ($P=0,03$). Under det andra avbetningstillfället skiljde sig foderlosta mot rörsvingel och ängssvingel samtidigt som timotej skiljde sig mot ängssvingel ($P<0,04$). Vid den tredje avbetningstidpunkten skiljde sig foderlosta mot rörsvingel, timotej och ängssvingel, samtidigt som hundäxing skiljde sig mot ängssvingel ($P<0,04$). Vid den fjärde avbetningstidpunkten fanns inga skillnader mellan arterna. Felstaplar anger medelfel.

Avbetningstidpunkten påverkade inte innehållet av total WSC på samma sätt för alla gräsarter då rörsvingel och ängssvingel hade samma innehåll av WSC vid det första och fjärde avbetningstillfället. Engelskt rajgräs hade samma WSC-halt mellan den andra och tredje avbetningstidpunkten. Hundäxing och timotej hade samma innehåll av WSC vid de tre sista respektive tre första avbetningstidpunkterna. För de övriga avbetningstillfällena var inverkan av innehållet av WSC varierat mellan de olika gräsarterna (figur 3).



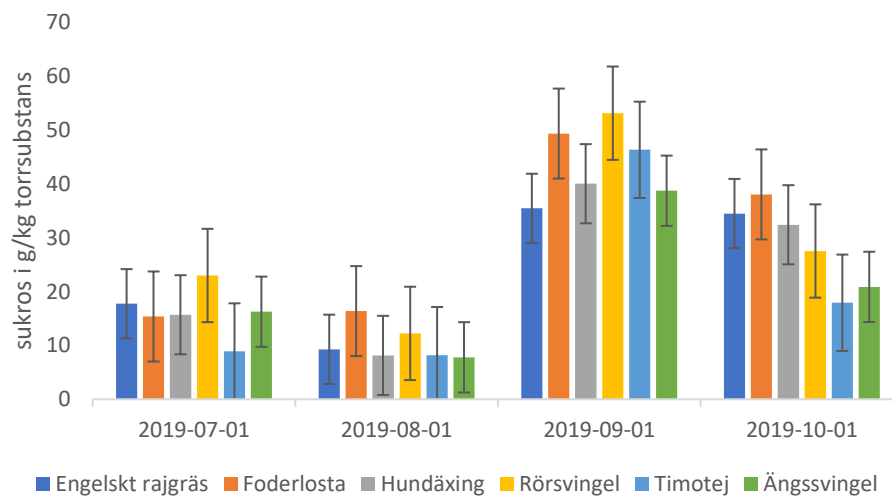
Figur 3. Genomsnittligt innehåll av lättlösliga kolhydrater (WSC) i olika gräsarter provtagna vid olika avbetningstidpunkter. Vid det första avbetningstillfället skiljde sig foderlosta mot alla arter utom timotej ($P < 0,04$) samtidigt som timotej skiljde sig mot engelskt rajgräs och rörsvingel ($P < 0,04$). Under den andra avbetningstidpunkten skiljde sig foderlosta mot timotej ($P = 0,03$) samtidigt som hundäxing skiljde sig mot rörsvingel och timotej ($P < 0,04$). Vid det tredje avbetningstillfället fanns inga skillnader mellan arterna. Vid det fjärde avbetningstillfället skiljde sig engelskt rajgräs mot hundäxing och timotej ($P < 0,03$). Felstaplar anger medelfel.

Vid det fjärde avbetningstillfället var innehållet av glukos högre hos alla gräsarter i jämförelse med de övriga avbetningstidpunkterna. Inverkan av avbetningstidpunkt på glukosinnehållet varierade för de olika gräsarterna vid övriga tidpunkter. Endast foderlosta hade en glukoskoncentration som skiljde sig åt mellan samtliga avbetningstidpunkter (figur 4).



Figur 4. Genomsnittligt innehåll av glukos i olika gräsarter provtagna vid olika avbetningstidpunkter. Vid den första avbetningstidpunkten fanns en skillnad mellan foderlosta och ängssvingel ($P < 0,05$). Vid det andra samt tredje avbetningstillfället skiljde sig hundäxing mot rörsvingel och timotej ($P < 0,04$). Det fanns inga skillnader mellan arterna vid det fjärde avbetningstillfället. Felstaplar anger medelfel.

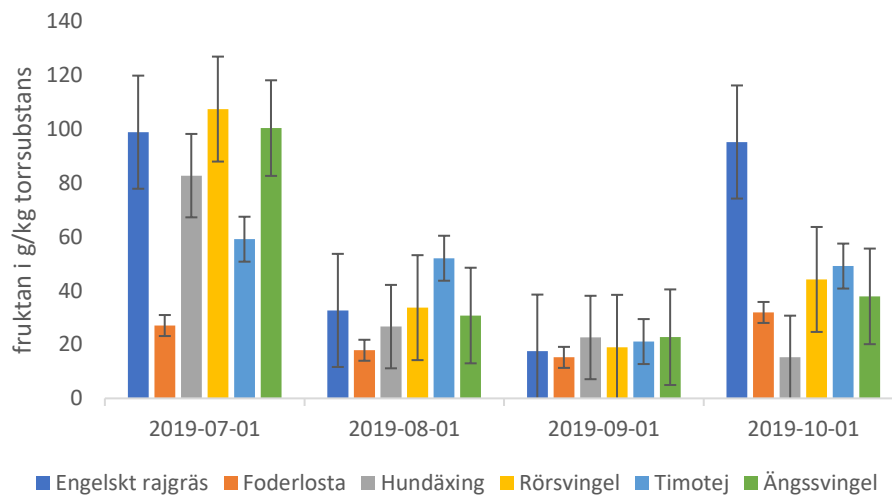
Vid det tredje avbetningstillfället var innehållet av sukros högre än vid det första och andra avbetningstillfället hos samtliga gräsarter. De fanns varierad inverkan på sukros-innehållet vid de övriga avbetningstidpunkterna för de olika gräsarterna (figur 5).



Figur 5. Genomsnittligt innehåll av sukros i olika gräsarter provtagna vid olika avbetningstidpunkter. Vid den första avbetningstidpunkten skiljde sig timotej mot alla andra gräsarter ($P < 0,01$) samtidigt som rörsvingel skiljde sig mot foderlosta, hundäxing och ängssvingel ($P < 0,008$). Vid det andra

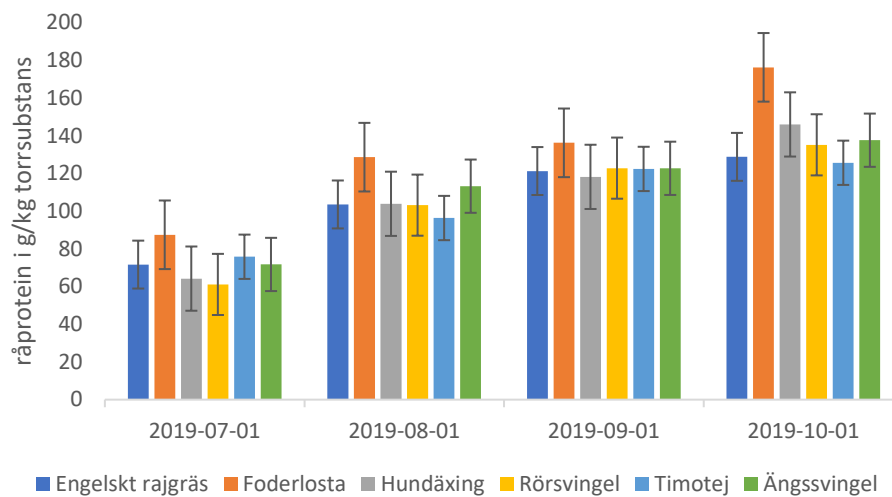
avbetningstillfället skiljde sig foderlosta mot alla arter utom rörsvingel ($P < 0,03$). Det fanns inga skillnader mellan gräsarter vid de tredje och fjärde avbetningstillfällena. Felstaplar anger medelfel.

Avbetningstidpunkten påverkade inte innehållet av fruktan på samma sätt för de olika gräsarterna (figur 6). Hundäxing och ängssvingel hade samma innehåll av fruktan vid de tre sista avbetningstidpunkterna. Tidpunkten för avbetning hade mer varierad inverkan på fruktaninnehållet för de övriga gräsarterna (figur 6).



Figur 6. Genomsnittligt innehåll av fruktan i olika gräsarter provtagna vid olika avbetningstidpunkter. Vid det första avbetningstillfället skiljde sig foderlosta mot alla andra gräsarter ($P < 0,03$) samtidigt som timotej skiljde sig mot alla andra arter utom hundäxing ($P < 0,006$). Vid den andra avbetningstidpunkten skiljde sig timotej mot alla andra gräsarter ($P < 0,05$). Det fanns inga skillnader mellan arter vid det tredje avbetningstillfället. Vid den fjärde avbetningstidpunkten skiljde sig engelskt rajgräs mot alla andra gräsarter ($P < 0,05$) samtidigt som hundäxing skiljde sig mot rörsvingel och timotej ($P < 0,02$). Felstaplar anger medelfel.

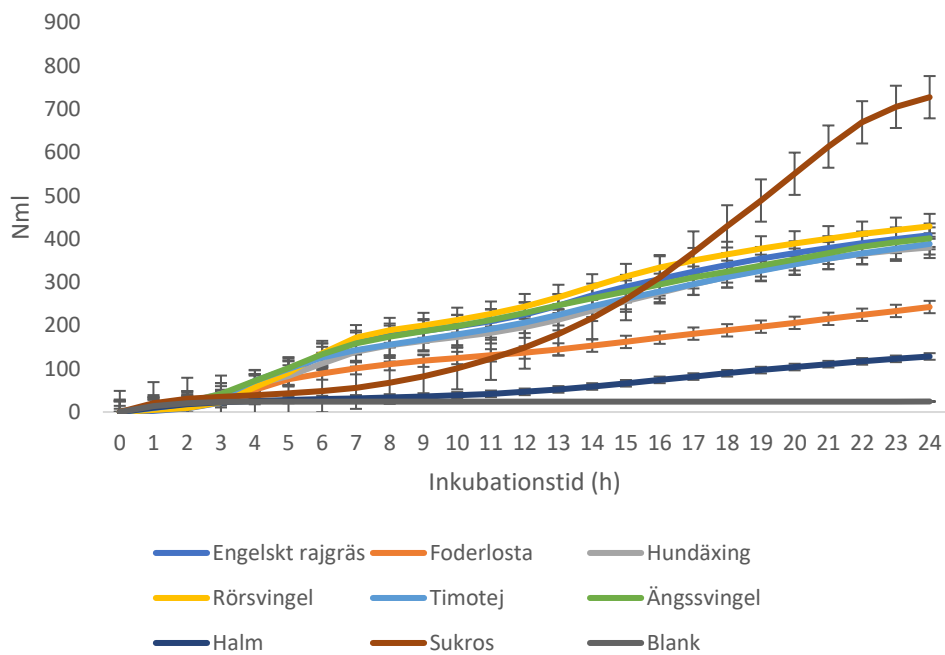
Vid den första avbetningstidpunkten var innehållet av råprotein lägre för samtliga gräsarter i jämförelse med de övriga avbetningstidpunkterna. Dessa avbetningstillfällen hade varierad inverkan på råproteinhalten i de olika gräsarterna. Endast ängssvingel hade samma innehåll av råprotein vid alla avbetningstidpunkter utom den första (figur 7).



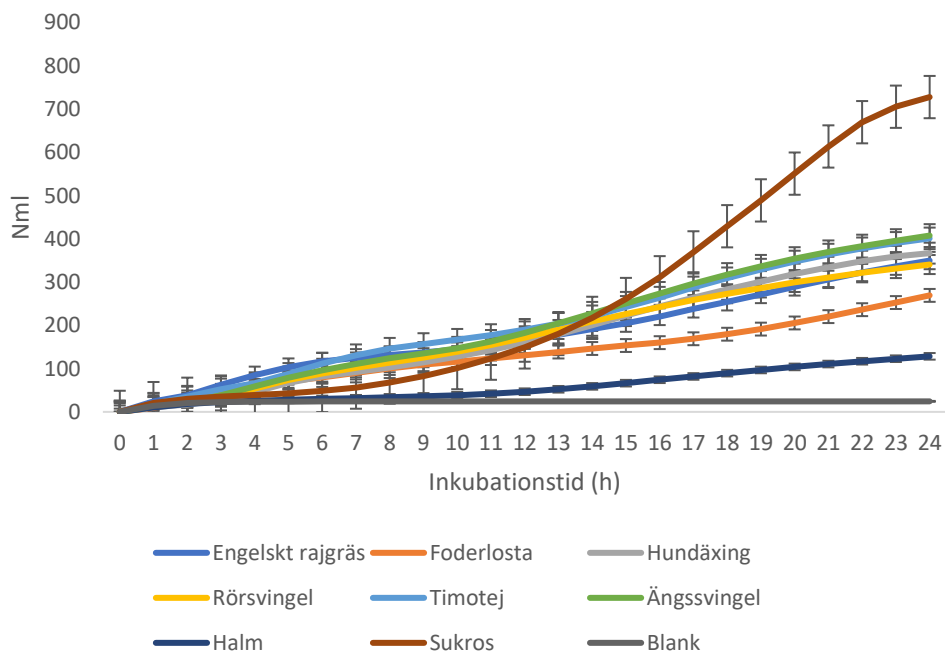
Figur 7. Genomsnittligt innehåll av råprotein i olika gräsarter provtagna vid olika avbetningstidpunkter. Vid det första avbetningstillfället skiljde sig foderlost mot alla andra gräsarter ($P < 0,01$) samtidigt som rörsvingel skiljde sig mot engelskt rajgräs, timotej och ängssvingel ($P < 0,03$). Vid detta tillfälle skiljde sig även hundäxing mot timotej ($P = 0,01$). Vid den andra avbetningstidpunkten skiljde sig foderlost mot alla andra arter utom ängssvingel ($P < 0,003$). Vid det tredje avbetningstillfället skiljde sig foderlost mot alla andra gräsarter ($P < 0,03$). Det fanns inga skillnader mellan arter vid det fjärde avbetningstillfället. Felstaplar anger medelfel.

4.2 Gasmätningar *in vitro* med hästräck som inokulant

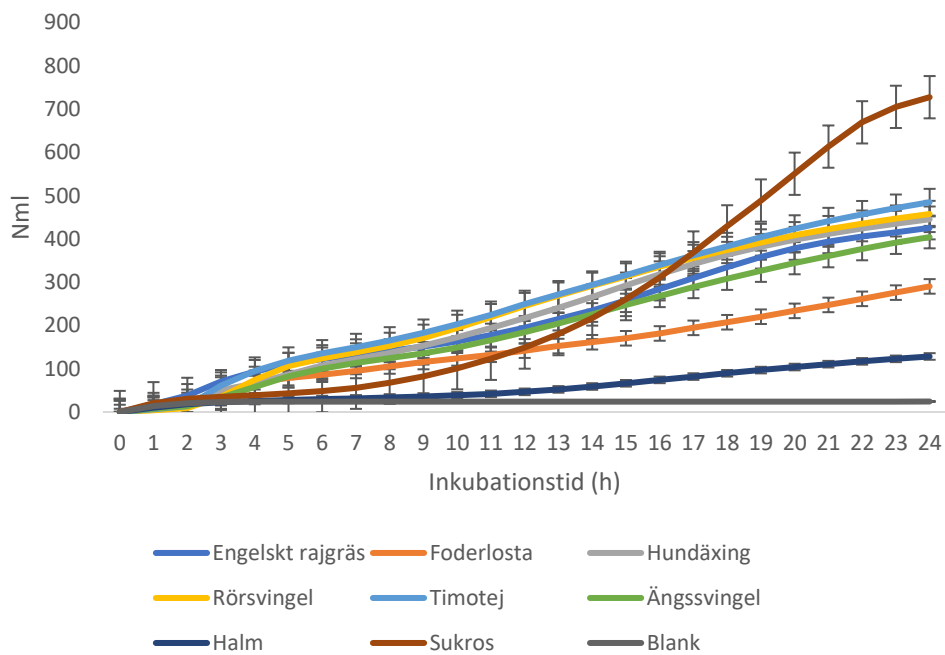
Totalt ackumulerad gasvolym över 24 h inkubation för samtliga gräsarter och kontrollprov presenteras i figur 8–11. Vid de tre första avbetningstillfällena var kurvorna för totalt ackumulerad gasvolym relativt lika mellan och inom gräsart med undantag för foderlost (figur 8–10). Vid det sista avbetningstillfället var kurvorna för totalt ackumulerad gasvolym mer olika mellan gräsarterna än vid de övriga avbetningstillfällena (figur 11).



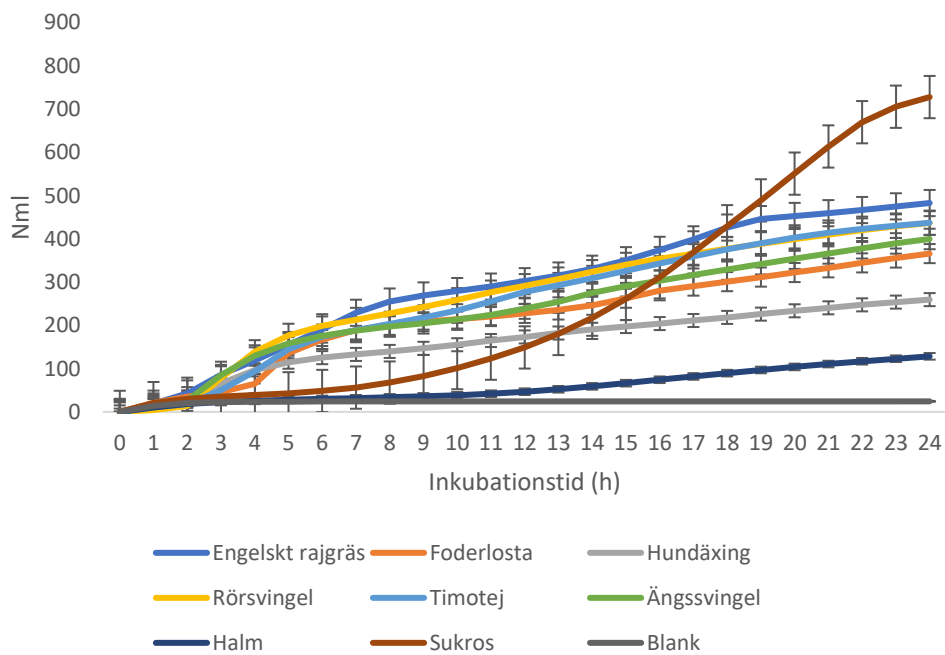
Figur 8. Total gasvolym i Nml över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det första avbetningstillfället (2019-07-03) samt genomsnitt för kontroller (halm, sukros, blank (=buffert)) från samtliga omgångar. Felstaplar anger medelfel.



Figur 9. Total gasvolym i Nml över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det andra avbetningstillfället (2019-08-01) samt genomsnitt för kontroller (halm, sukros, blank (=buffert)) från samtliga omgångar. Felstaplar anger medelfel.



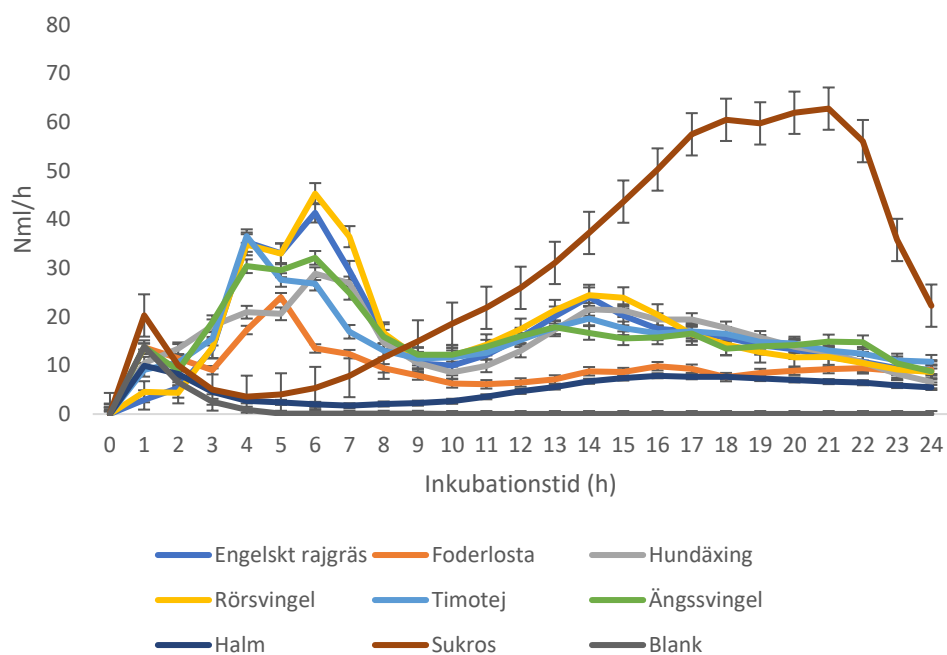
Figur 10. Total gasvolym i Nml över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det tredje avbetningstillfället (2019-09-02) samt genomsnitt för kontroller (halm, sukros, blank (=buffert)) från samtliga omgångar. Felstaplar anger medelfel.



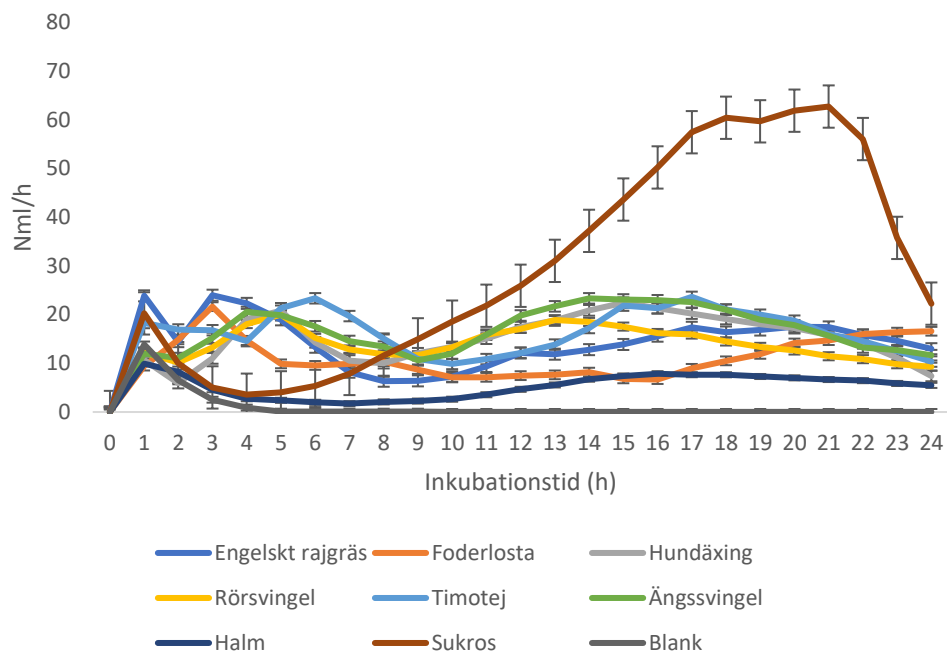
Figur 11. Total gasvolym i Nml över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det fjärde avbetningstillfället (2019-10-29) samt genomsnitt för kontroller (halm, sukros, blank (=buffert)) från samtliga omgångar. Felstaplar anger medelfel.

4.3 Fermentationshastighet

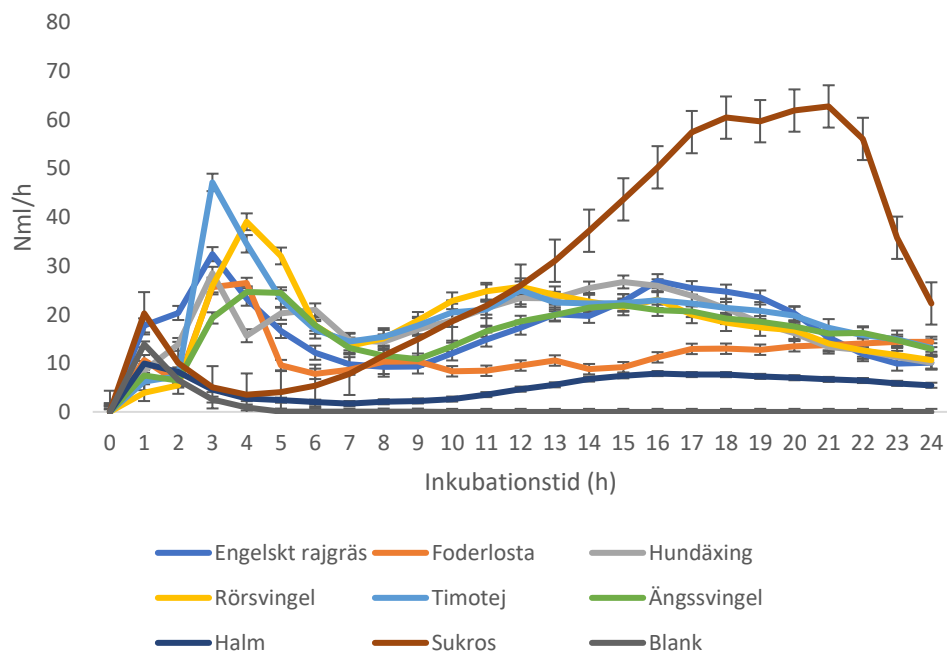
Fermentationshastighet över 24 h inkubation för samtliga gräsarter och kontrollprov presenteras i figur 12–15. Kurvorna över fermentationshastigheten mellan och inom gräsart verkade vara olika mellan de olika avbetningstillfällena (figur 12–15). Prover från det sista avbetningstillfället verkade avvika i kurvans utseende gentemot de tidigare avbetningstillfällena.



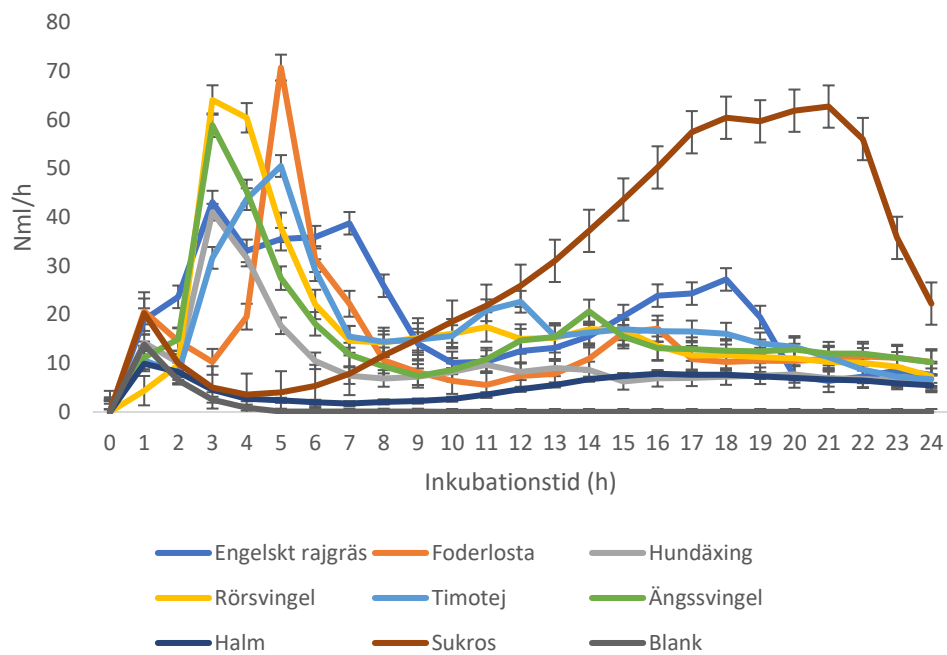
Figur 12. Fermentationshastighet i Nml/h över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det första avbetningstillfället (2019-07-03) samt genomsnitt för kontroller (halm, sukros, blank (=buffert)) från samtliga omgångar. Felstaplar anger medelfel.



Figur 13. Fermentationshastighet i Nml/h över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det andra avbetningstillfället (2019-08-01) samt genomsnitt för kontroller (halm, sukros, blank (=buffert)) från samtliga omgångar. Felstaplar anger medelfel.



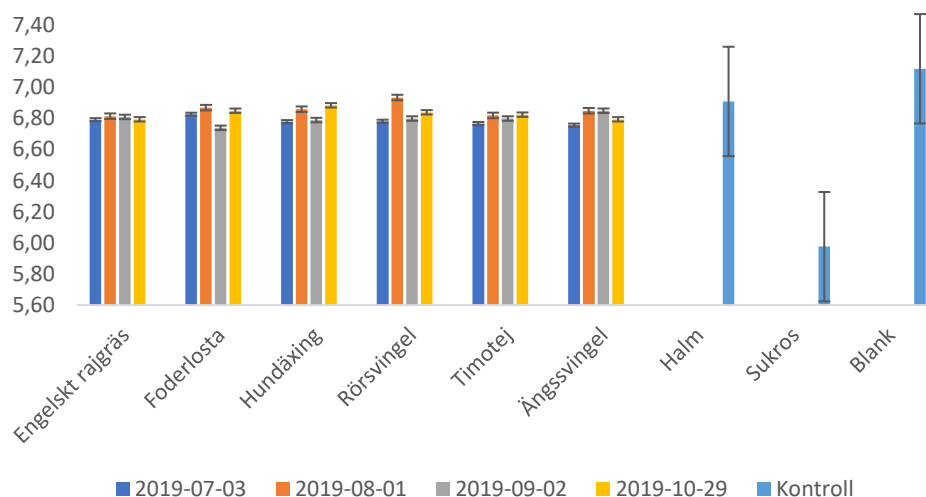
Figur 14. Fermentationshastighet i Nml/h över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det tredje avbetningstillfället (2019-09-02) samt genomsnitt för kontroller (halm, sukros, blank (=buffert)) från samtliga omgångar. Felstaplar anger medelfel.



Figur 15. Fermentationshastighet i Nml/h över 24 h i genomsnitt från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna vid det fjärde avbetningstillfället (2019-10-29) samt genomsnitt för kontroller (halm, sukros, blank (=buffert)) från samtliga omgångar. Felstaplar anger medelfel.

4.4 pH-mätningar

Uppmätt pH-värde efter 24 h inkubering för samtliga gräsarter och kontrollprov presenteras i figur 16. Uppmätta pH värden mellan de olika avbetningstidpunkterna och gräsarterna varierade från 6,74–6,94.



Figur 16. pH värdet efter 24 h inkubering, medel från två replikata inkubationer för de olika gräsarterna samt medel för kontroller (halm, sukros, blank (=buffert)) från samtliga omgångar. Felstaplar anger medelfel.

4.5 Gräsprovernas kemiska sammansättning och dess korrelation till gasproduktion *in vitro*

Den ackumulerade gasvolymen vid 6, 12 och 24 h hade både positiva och negativa linjära samband med kemisk sammansättning och pH (tabell 2). Negativa korrelationer återfanns mellan den ackumulerade gasvolymen (vid alla tidpunkterna) och koncentrationerna av ADF och NDF samt pH (tabell 2). Positiva korrelationer återfanns mellan ackumulerad gasvolym vid 6 h och de resterande variablerna utom sukroshalten (tabell 2).

Koncentrationen av total WSC hade högst korrelation med total gasvolym vid 6 och vid 12 h, och korrelationskoefficienterna var positiva (tabell 2). Innehållet av glukos och fruktos var positivt korrelerade med total gasvolym vid 6 och vid 12 h, men inte vid 24 h. Total gasvolym vid 24 h hade starkast korrelationskoefficient med gräsets innehåll av ADF följt av NDF, och korrelationskoefficienterna var negativa (tabell 2).

Tabell 2. Pearson korrelationskoefficienter mellan total gasvolym vid *in vitro*-fermentation vid 6, 12 och 24 h och kemisk sammansättning i gräsprover. Samtliga sex gräsarter som provtagits vid fyra olika tidpunkter ingick i datasetet. pH mätt efter 24 h inkubering

	6h	12h	24h
pH	-0,47**	-0,56**	-0,56**
Glukos	0,85***	0,64***	0,31
Fruktos	0,85***	0,69***	0,35
Sukros	0,25	0,31	0,30
Fruktan	0,41*	0,52**	0,44*
Lättlösliga kolhydrater	0,86***	0,82***	0,54**
Neutral detergent fiber	-0,77***	-0,71***	-0,54**
Acid detergent fiber	-0,77***	-0,75***	-0,63***
Råprotein	0,39*	0,25	0,16

*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,0001$ för korrelationen

5 Diskussion

5.1 Kemisk sammansättning

Under betessäsongen är betesgräset i ett dynamiskt tillstånd och påverkas av flera komplexa processer. En välskött betesmark som erbjuder tillräckligt med gräs och näring kan möta hästens näringsbehov under betessäsongen (Longland, 2012). I en global enkätundersökning har hästägare rapporterat att många hästar har tillgång till betesgräs men av vilka arter framgår inte, samtidigt som det verkar finnas en viss okunskap gällande utfodring till häst (Murray *et al.*, 2015). Med resultaten från den här studien finns det möjlighet att öka medvetandegraden hos hästägare med avseende på kolhydratsammansättning och hur det skulle kunna påverka gasproduktionen i hästens grovtarm. Att hålla hästar på bete har fördelar vad gäller ekonomiska aspekter för hästägaren samt hästens möjlighet att uttrycka naturliga beteenden och social interaktion, samtidigt som det medför risk för överkonsumtion och betesrelaterade hälsoproblem (Longland, 2012; Hoskin & Gee, 2011). Det är tidigare känt att betesgräsets näringsmässiga kvalitet påverkas av bland annat repetitiv avbetning, gräsets genetiska kapacitet, botaniskt utvecklingsstadium, klimat och gödsling (Jensen *et al.*, 2014; Virkajärvi *et al.*, 2012; McDonald *et al.*, 2011; Steward & Hayes, 2011; Čop *et al.*, 2009; Thorvaldsson *et al.*, 2007; Delagarde *et al.*, 2000; Donaghy & Fulkerson, 1997). I den här studien fanns det interaktionseffekter mellan gräsart och avbetningstidpunkt för bland annat innehållet av NDF, råprotein och WSC, vilket medför att gräsarterna kan ha olika näringsinnehåll vid de olika avbetningstidpunkterna. Alla gräsarter svarade inte likadant på upprepad simulerad avbetning under en betessäsong, trots att de odlats på samma plats, gödslats och ”betats” på samma sätt och därmed utsatts för samma omgivande miljöfaktorer. Det innebär att artskillnader mellan gräsen kan vara viktiga att ta hänsyn till för olika hästkategorier som ska hållas på bete.

Innehållet av WSC i bete är av särskilt intresse för häst eftersom ett högt intag kan bidra till utveckling av bland annat fång, både via grovtarmsstörningar som antas bero på högt fruktanintag och via höga insulinhalter som svar på högt glukosintag (Bamford *et al.*, 2014; Ince *et al.*, 2014; Longland & Byrd, 2006; Al Jassim *et al.*, 2005). I en brittisk studie rapporterades att de flesta fallen av fång inträffade under försommaren (Menzies-Gow *et al.*, 2010). I den här studien saknas dock betesprover från denna period, vilket hade varit intressant att undersöka då tidigare studier påvisat höga WSC-halter både under vår och höst (Rivero *et al.*, 2019; Kagan *et al.*, 2011). I den föreliggande studien var innehållet av WSC högst vid sista avbetningstidpunkten för de flesta gräsarter, vilket är ett resultat av grässets försvar mot kallare temperatur (Sanada *et al.*, 2007; Atkin & Tjoelker, 2003). Detta kan medföra att det finns en ökad risk för utveckling av fång under senare delen av betessäsongen när den omgivande temperaturen sjunker. Högst innehåll av WSC påvisades i engelskt rajgräs vid sista avbetningstidpunkten samtidigt som hundäxing hade lägst innehåll av WSC vid denna tidpunkt.

Innehållet av fruktan och total WSC var för majoriteten av gräsarterna högst vid det första och sista avbetningstillfället. Vid dessa avbetningstidpunkter stod innehållet av fruktan för 10–55 % av den totala WSC fraktionen. Den höga fruktanhalten vid sista avbetningstidpunkten stämmer överens med tidigare studier där innehållet av WSC varit högt under hösten när den omgivande temperaturen minskat (Rivero *et al.*, 2019), vilket har lett till en ökad ackumulering av fruktan som förberedelse hos plantan inför den kommande vintern (Sanada *et al.*, 2007). Den högsta uppmätta fruktanhalten i denna studie var 107 g/kg ts hos rörsvingel vid första avbetningstidpunkten. För hästar på bete som påvisats kunna konsumera upp till 4,9 % av sin kroppsvikt (KV) i kg ts/dygn (Longland *et al.*, 2011), innebär detta en daglig konsumtion på 5,2 g fruktan/kg KV. Denna mängd är drygt hälften av de fruktandoser som använts för att framkalla fång i experimentella studier (Milinovich *et al.*, 2008). Inducerad fång kan dock inte likställas med fång som uppkommer spontant på bete, eftersom fruktantypen inulin använts för att framkalla fång (Milinovich *et al.*, 2008), vilken skiljer sig i både bindningstyp och kedjelängd från levan som är den vanligaste typen av fruktan i betesgräs (McDonald *et al.*, 2011; Nelson & Spollen, 1987). Vidare forskning behövs dock för att få kunskap om hur fruktaner bryts ner i hästens digestionskanal så att en utvärdering av fruktanhaltens betydelse i betesgräs för häst kan göras.

För ett betesgräs med lågt innehåll av fruktaner eller WSC kan foderlösa och hundäxing vara lämpliga arter, då dessa hade låga halter över de olika avbetningstidpunkterna i den här studien. Timotej hade samma halter av både fruktan och WSC som hundäxing vid första avbetningstidpunkten, men halterna ökade till relativt höga nivåer vid de senare avbetningstillfällena. Därmed kan timotej vara en lämplig gräsart under ett avbetningstillfälle efter en första skörd, men inte vid upprepade

avbetning om målsättningen är att uppnå låga nivåer av fruktaner eller WSC. De övriga gräsarterna påvisade högre innehåll av fruktan respektive WSC över de olika avbetningstidpunkterna och är därmed mindre lämpliga som betesgräs om syftet är ett lågt innehåll av densamma.

Det är dock inte enbart mängden WSC i betesgräs som är av intresse eftersom både koncentration och smältbarhet av fiber är det som i störst utsträckning bestämmer hur mycket av grässets energiinnehåll som hästen kan utnyttja (Harris *et al.*, 2009). Betesgrässets innehåll av NDF ökar och råprotein minskar i takt med ökad plantmognad samtidigt som smältbarheten minskar till följd av ökad lignifiering (Särkijärvi *et al.*, 2012b; McDonald *et al.*, 2011). I den här studien skördades gräsarterna upprepade gånger för att simulera avbetning under en betessäsong och därmed skördades betesproverna i ett relativt tidigt botaniskt utvecklingsstadium. Innehållet av NDF och råprotein varierade mellan de olika gräsarterna och avbetningstidpunkterna. För de flesta gräsarter var innehållet av NDF lägst vid sista avbetningstidpunkten och innehållet av råprotein var högt, vilket tyder på att gräset vid sista avbetningstidpunkten skördades i ett tidigare botaniskt utvecklingsstadium än vid de övriga avbetningstillfällena. Detta stämmer även överens med innehållet av glukos och sukros som var högt vid denna avbetningstidpunkt i den här studien, vilket är i linje med tidigare studier där högst koncentration av glukos och sukros har uppmätts i tidigt utvecklingsstadium (Chatterton *et al.*, 2006; Shewmaker *et al.*, 2006). En minskad temperatur hämmar ackumuleringen av fiber i betesgräset (McDonald *et al.*, 2011; Thorvaldsson *et al.*, 2007), vilket även kan förklara varför innehållet av NDF var lägre vid det sista avbetningstillfället då temperaturen förmodligen var lägre. Detta har i tidigare studier påvisats där gräs som skördats upprepade gånger haft en högre smältbarhet under sensommaren till följd av det lägre innehållet av fiber (Thorvaldsson *et al.*, 2007). Detta är delvis en konsekvens av den lägre temperaturen (Thorvaldsson *et al.*, 2007), men även tiden mellan avbetningstillfällena som inverkar på återväxtnöjligheten.

5.2 Total gasvolym

Den totala gasproduktionen vid 6 h påverkades mest av innehållet av total WSC varav främst glukos och fruktos samtidigt som innehållet av ADF och NDF hade en negativ korrelation med gasproduktionen vid 6 h. Detta medför att ett högre innehåll av WSC och fiber bidrar till en större respektive lägre ackumulerad gasvolym efter 6 h. Vid 12 h påvisades samma mönster där korrelationskoefficienten mellan glukos eller fruktos och gasvolymen minskat och vid 24 h påvisades ingen korrelation mellan innehållet av glukos eller fruktos och gasproduktionen, samtidigt som den negativa korrelationen med ADF och NDF blivit lägre. Detta tyder på att desto längre

fermentationen *in vitro* fortskrider, desto mindre viktiga blir glukos och fruktos som substrat.

Den största andelen av den totalt ackumulerade gasvolymen vid 24 h hade bildats vid 12 h. Vid denna tidpunkt såg innehållet av WSC mellan de olika gräsarterna ut att stämma överens med respektive gasproduktionskurva mellan gräsarter och avbetningstidpunkter, då ett lågt eller högt innehåll av WSC verkade bidra till låg respektive hög gasproduktion. Detta var som mest tydligt vid sista avbetningstidpunkten där gaskurvorna såg mest olika ut, då även engelskt rajgräs och hundäxing hade högst respektive lägst koncentration av WSC. Innehållet av WSC hos dessa gräsarter stämmer överens med resultat från en tidigare studie som också påvisat höga och låga WSC-koncentrationer hos engelskt rajgräs respektive hundäxing (Jensen *et al.*, 2014). Det är tidigare påvisat att NSC fermenteras snabbare än strukturella kolhydrater vid *in vitro*-inkubering (Elghandour *et al.*, 2016), vilket innebär att hög NSC-halt kan bidra till en större gasvolym under tidig inkubering. Vid de tre första avbetningstillfällena verkade foderlösta ha en mindre volym producerad gas än de övriga gräsarterna. Foderlösta har tidigare påvisats ha ett högt innehåll av NSC (Zhao *et al.*, 2008), vilket inte stämmer överens med resultaten i den här studien. Foderlösta verkade inte klara att återväxa vid den upprepade avbetningen, vilket kan bero på att den eroderat sina energireserver som resulterat i ett lägre innehåll av WSC. Denna art är främst förekommande i slåttervallar (Fogelfors, 2012), och är mindre lämplig som betesgräs.

I senare delen av inkuberingen hade den negativa korrelationen mellan mängden producerad gas vid 24 h och innehållet av fiber blivit lägre än vid 6 och 12 h. Detta medför att ett högre innehåll av NDF bidrar till lägre gasproduktion vid 24 h, vilket ser ut att stämma överens med resultaten i den här studien. Hos de flesta gräsarter var innehållet av NDF lägst vid sista avbetningstidpunkten då kurvorna över total gasvolym vid 24 h såg ut att uppnå högre värden än vid de andra avbetningstidpunkterna. Vid sista avbetningstidpunkten var betesgräset i ett tidigt botaniskt utvecklingsstadium, vilket därmed bidrog till en högre smältbarhet av organisk substans (McDonald *et al.*, 2011; Särkijärvi *et al.*, 2012b). Detta stämmer överens med tidigare studier där gräsprover skördade i ett tidigt botaniskt utvecklingsstadium har bidragit till en högre total gasproduktion *in vitro*, som minskat med ökad plantmognad (Ersahince & Kara, 2017; Cone *et al.*, 1998).

5.3 Fermentationshastighet

Fermentationshastigheten är av särskilt intresse för häst där en alltför snabb produktion av gas som överstiger kapaciteten för upptag av gasen i tarmen kan leda till att hästen drabbas av gaskolik (Frape, 2010). Ett högt innehåll av WSC bidrar till en

snabb fermentation *in vitro* (Elghandour *et al.*, 2016) och då främst under tidig inkubering, vilket korrelationskoefficienterna i denna studie också tyder på. Högst innehåll av WSC påvisades för de flesta gräsarter vid sista avbetningstidpunkten. Detta ser ut att stämma överens med kurvorna för fermentationshastigheten som verkade vara snabbast vid sista avbetningstillfället för samtliga gräsarter. Vid denna avbetningstidpunkt hade engelskt rajgräs och hundäxing den högsta respektive lägsta uppmätta halten av total WSC. Hundäxing som hade låg fermentationshastighet vid sista avbetningstidpunkten hade högst innehåll av NDF. Detta var dock inte fallet med engelskt rajgräs som hade ett lägre innehåll av NDF, vilket stämmer överens med tidigare studier som påvisat ett lägre innehåll av NDF hos engelskt rajgräs i jämförelse med andra gräsarter (Thorvaldsson *et al.*, 2007). Detta medför att fermentationshastigheten inte enbart verkar kunna förklaras av innehållet av WSC och NDF.

Vid sista avbetningstidpunkten utgjorde fruktaner en större andel av den totala WSC fraktionen hos engelskt rajgräs än hos de övriga gräsarterna. Det har tidigare påvisats att ett högt innehåll av fruktaner bidrar till en snabbare fermentation *in vitro* (Ince *et al.*, 2014). Detta kan dock inte förklara fermentationshastigheten hos engelskt rajgräs, men däremot kan fruktanerna i engelskt rajgräs haft en längre kedjelängd, vilket resulterar i en långsammare fermentation jämfört med fruktaner med kortare kedjelängd (Ince *et al.*, 2014). Detta kan vara förklaringen till varför fermentationshastigheten för engelskt rajgräs ser mer annorlunda ut än för de andra arterna vid sista avbetningstidpunkten.

5.4 pH

Fruktaner och hydrolyserbara kolhydrater har en snabb fermentationshastighet om de når grovtarmen hos häst (Hoffman *et al.*, 2001; Hoffman, 2009), vilket genom ökad laktatproduktion kan resultera i grovtarmsacidosis och vidare bidra till utveckling av fång via endotoxinemi (Ince *et al.*, 2014; Al Jassim *et al.*, 2005). pH-värdet efter avslutad inkubering *in vitro* påverkas av mängden buffert i förhållande till substrat, men kan ge en viss indikation på mängden producerad VFA och laktatproduktionen från fermentationen (Elghandour *et al.*, 2016). Det uppmätta pH-värdet för samtliga gräsarter och avbetningstillfällen var dock nära värden som tidigare uppmätts i grovtarmen hos hästar på bete (Mackie & Wilkins, 1988), vilket indikerar att proportionerna av substrat och buffert i den här studien gett liknande pH-värden som tidigare uppmätts *in vivo*. I tidigare studier där fång har framkallats genom överkonsumtion av fruktaner har pH-värdet i cecum sjunkit under 5 (Milinovich *et al.*, 2008). Ett så pass lågt pH uppmättes inte ens för kontrollprovet med hög smältbarhet (sukros) i detta arbete, vilket delvis förhindras med buffertlösningen som

användes. Användning av buffertlösning är nödvändig eftersom det är ett stängt system där producerad VFA som normalt absorberas och därmed förhindrar en sur miljö förblir kvar i inkuberingsflaskorna (Cone *et al.*, 1998).

5.5 Gasproduktionstekniken

Betesproverna i detta arbete innehöll fraktioner som bland annat hydrolyserbara kolhydrater, fett och protein som generellt bryts ned i tunntarmen hos hästen (Frape, 2010; Hoffman, 2009). Detta medför att dessa fraktioner vid *in vitro*-inkubation fermenteras av mikroorganismerna och bidrar till gasproduktionen genom produktionen av VFA (Blümmel & Ørskov, 1993; Beuvink & Spoelstra, 1992). Tidigare *in vitro*-studier har påvisat att fett och protein bidrar till en relativt liten mängd gas i förhållande till kolhydraternas bidrag (Cone & Gelder, 1999; Menke *et al.*, 1979). I den här studien påvisades en positiv korrelation mellan innehållet av råprotein samt ackumulerad gasvolym vid 6 h, men ingen korrelation påvisades vid 12 eller 24 h. Det är känt att olika substrat kan resultera i varierad proportion av de olika syrorna samt mängden gas som produceras (Blümmel & Ørskov, 1993), vilket medför att det vidare hade varit intressant att titta på proportionen av den VFA som producerats för att veta vilka mikroorganismgrupper som varit aktiva i fermenteringen.

Vid *in vitro* försök är det av intresse att efterlikna fysiologiska förhållanden som sker *in vivo* (Coles *et al.*, 2005), vilket medför att enzymatisk förbehandling innan inkubering kan vara aktuellt för att i större utsträckning efterlikna digestion som sker innan fodret passerar till grovtarmen. Sockerarterna glukos, fruktos och sukros bryts ner enzymatiskt innan de absorberas i tunntarmen (Frape, 2010; Hoffman, 2009), vilket medför att dessa sockerarter inte bidrar till någon gasproduktion i hästens grovtarm. Detta är dock inte fallet vid *in vitro*-fermentering då glukos och fruktos bidrar till den totala gasvolymen vid 6 och 12 timmar enligt korrelationskoefficienterna i den här studien. Fruktanernas nedbrytning i hästens digestionskanal är inte helt klarlagt och en viss mängd verkar kunna brytas ner före grovtarmen (Bachmann *et al.*, 2019; Coenen *et al.*, 2006), vilket därmed inte skulle ge upphov till någon gasbildning *in vivo*. Andra studier antar dock att fruktanerna passerar mer eller mindre oförändrade till grovtarmen där mikrobiell fermentering av dem sker (Longland *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2001). Resultaten från korrelationskoefficienterna i den här studien tyder dock på att fruktanerna bidrar till gasproduktion vid *in vitro*-fermentering vid 6, 12 och 24 timmars inkubering.

Trots detta har en tidigare *in vitro*-studie påvisat att förbehandling med pepsin och α -amylas inte är nödvändigt för fiberrika fodermedel, då förbehandlade och icke förbehandlade grovfoderprover inte uppvisade någon större skillnad i gasproduktionen eller smältbarhet av organisk substans (Abdouli & Attia, 2007). Detta tyder

på att enzymatisk förbehandling med pepsin och α -amylas inte heller är nödvändig för betesgräs som däremot har en viss skillnad i kemisk sammansättning mot havrehö som användes i studien av Abdouli & Attia (2007). Däremot påvisades en betydligt större skillnad i gasproduktion hos de kraftfodermedel (korn och sojamjöl) som användes (Abdouli & Attia, 2007), vilket medför att enzymatisk förbehandling med pepsin och α -amylas är mer relevant för dessa typer av fodermedel som har ett högre innehåll av protein och stärkelse.

Betesproverna som användes i detta arbete hade endast förberetts genom förtorkning och malning, vilket är vanligt i *in vitro*-studier med mätning av gasproduktion. Detta skulle kunna påverka den totala gasproduktionen och fermentationshastigheten genom ökad mikrobiell nedbrytning (Murray *et al.*, 2010; Calabrò *et al.*, 2005; Lowman *et al.*, 2002). Lowman *et al.* (2002) påvisade en ökad gasproduktion först när foderproverna malts under 1,2 mm, vilket är mindre än 1,6 mm som tidigare studier har påvisat att hästar maler fiberrika fodermedel till i munhålan (Meyer *et al.*, 1975). Detta medför att malningen i den här studien inte borde ha påverkat gasproduktionen i någon större utsträckning. Det behövs mer forskning för att undersöka vilken partikelstorlek och vilken förbehandling som är mest lämplig vid *in vitro*-studier för att i större utsträckning efterlikna det som sker *in vivo* hos häst.

Hästens mikroflora är komplex och skiljer sig åt mellan olika delar av digestionskanalen (Salem *et al.*, 2018; Grimm *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2015). Detta medför att träcken som används för *in vitro*-inkubation inte nödvändigtvis speglar den mikrobiella sammansättningen och aktiviteten som sker *in vivo* i alla delar av magtarmkanalen. Trots detta har tidigare studier inte påvisat skillnader i gasproduktion när träck och vätska från cecum använts som inokulant vid *in vitro* fermentation (Murray *et al.*, 2014). Det är sedan tidigare känt att donatorhästarnas utfodring kan påverka den mikrobiella sammansättningen och aktiviteten i träcken (Grimm *et al.*, 2017; Murray *et al.*, 2009; Rymer *et al.*, 2005), vilket medför att det är fördelaktigt att använda träck från mer än en häst vid *in vitro*-fermentationer. I detta arbete samlades träck in från två slumpmässigt utvalda hästar i samma besättning som utfodrades med en grovfoderbaserad foderstat. Det hade dock varit intressant att använda donatorhästar som gick på bete för att efterlikna betesgången i större utsträckning, vilket dock inte var möjligt i den här studien då den genomfördes under vårvintern.

Även om kemiska analyser ger god information om betesgräsets näringsinnehåll så ger det inte tillräckligt med information för att utvärdera det sanna näringsvärdet. Med gasproduktionstekniken kan dock den mikrobiella nedbrytningen utvärderas (Santos *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2009). Dessa *in vitro*-studier kräver inga fistulerade försökshästar och är ett snabbt och kostnadseffektivt alternativ till *in vivo*-studier (Murray *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2012). Avsaknaden av standardiserade metoder för användning av hästträck som inokulant är en nackdel med *in vitro*-studier (Franzan *et al.*, 2018), dels eftersom det medför svårighet att

jämföra resultat mellan studier samt att de bör associeras med *in vivo*-studier för att några säkra slutsatser ska kunna dras. Vidare studier behövs därmed för att standardisera gasproduktionstekniken med användning av hästräck som inokulant.

5.6 Begränsningar i studien

I detta projekt saknades replikat från mätning av gasproduktionen för de olika gräsarterna och avbetningstidpunkterna, vilket medförde att det inte gick att dra några slutsatser avseende skillnader i gasproduktionen *in vitro* mellan arter och avbetningstidpunkter. Anledningen till detta var den bristande provmängden, vilket gav en indikation på att gräsarter som foderlosta hade en låg återväxt under simulerad avbetning och kan därmed vara mindre lämpligt som betesgräs.

I den här studien har gräsarter som odlats i renbestånd använts för att kunna undersöka effekten av art som var av intresse. Detta speglar dock inte fullt ut hur det ser ut på de flesta hästgårdar. Gräsarter som foderlosta och timotej är arter som främst förekommer i slåttervallar (Fogelfors, 2012) och är därmed mindre vanliga betesgräs. De övriga arterna i den här studien är däremot arter som förekommer i större utsträckning på bete (Fogelfors, 2012). Det har tidigare påvisats i fältförsök att dessa olika gräsarter har en varierande hårdighet och konkurrenskraft (Halling, 2012). Det hade vidare varit intressant att undersöka hur dessa gräsarter hade uppträtt i blandbestånd med tanke på bland annat konkurrenskraft, trampåtlighet och intensitet på avbetning. Detta eftersom intensiteten på avbetningen kan påverka innehållet av bland annat fruktaner under nästkommande betessäsong (Benot *et al.*, 2018), vilket medför att det bör undersökas under mer än en betessäsong.

5.7 Slutsats

Det fanns interaktionseffekter mellan gräsart och avbetningstidpunkt på den kemiska sammansättningen i prover från sex olika gräsarter som provtagits vid fyra olika tidpunkter under en betessäsong. Det betyder att alla gräsarter inte svarade likadant på upprepad avbetning. Foderlosta verkade inte klara den upprepade avbetningen på grund av låg återväxt. Engelskt rajgräs hade ett högt innehåll av WSC och lågt innehåll av fiber samtidigt som hundäxing hade ett lågt innehåll av WSC och högt innehåll av fiber i relation till de övriga gräsarterna. Innehållet av WSC och fiber hade positiv respektive negativ korrelation med den totala gasproduktionen vid *in vitro*-fermentering med hästräck som inokulant. Dessa skillnader kan ha potentiell inverkan på hästens grovtarmsfermentation, vilket indikerades genom mätning av gasproduktion i *in vitro*-system i den här studien. Olika gräsarter kan därmed ha

en varierad lämplighet för olika kategorier av hästar under en betessäsong. Hypotesen om gasproduktion kunde inte utvärderas på grund av bristande provmängd.

Referenslista

- Abdoui, H., & Attia, S. B. (2007). Evaluation of a two-stage in vitro technique for estimating digestibility of equine feeds using horse faeces as the source of microbial inoculum. *Animal feed science and technology*, vol. 132(1-2), ss. 155-162.
- Al Jassim, R. A., & Andrews, F. M. (2009). The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, vol. 25(2), ss. 199-215.
- Al Jassim, R. A., Scott, P. T., Trebbin, A. L., Trott, D., & Pollitt, C. C. (2005). The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 248(1), ss. 75-81.
- Allen, E., Sheaffer, C., & Martinson, K. (2013). Forage nutritive value and preference of cool-season grasses under horse grazing. *Agronomy Journal*, vol. 105(3), ss. 679-684.
- Atkin, O. K., & Tjoelker, M. G. (2003). Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in plant science*, vol. 8(7), ss. 343-351
- Bamford, N. J., Potter, S. J., Harris, P. A., & Bailey, S. R. (2014). Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. *Domestic animal endocrinology*, vol. 47, ss. 101-107.
- Bachmann, M., Glatter, M., Bochnia, M., Greef, J. M., Breves, G., & Zeyner, A. (2019). Estimating compartmental and total tract apparent digestibility in horses using internal and external markers. *Livestock science*, vol. 223, ss. 16-23.
- Benot, M. L., Morvan-Bertrand, A., Mony, C., Huet, J., Sulmon, C., Decau, M. L., Prud'homme, M., & Bonis, A. (2019). Grazing intensity modulates carbohydrate storage pattern in five grass species from temperate grasslands. *Acta oecologica*, vol. 95, ss. 108-115.
- Beuvink, J. M. W., & Spoelstra, S. F. (1992). Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms in vitro. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 37(4), ss. 505-509.
- Blaser, R. E. (1964). Symposium on forage utilization: Effects of fertility levels and stage of maturity on forage nutritive value. *Journal of Animal Science*, vol. 23(1), ss. 246-253.
- Blümmel, M., & Ørskov, E. R. (1993). Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 40(2-3), ss. 109-119.
- Bowden, D. M., Taylor, D. K., & Davis, W. E. P. (1968). Water-soluble carbohydrates in orchardgrass and mixed forages. *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 48(1), ss. 9-15.

- Bremner, J. M., & Breitenbeck, G. A. (1983). A simple method for determining ammonium in semi-micro Kjeldahl analysis of soil and plant materials using block digester. *Communications in Soil Science and Plant analysis*, vol. 14, ss. 905-913.
- Calabrò, S., Cutrignelli, M. I., Piccolo, G., Bovera, F., Zicarelli, F., Gazaneo, M. P., & Infascelli, F. (2005). In vitro fermentation kinetics of fresh and dried silage. *Animal feed science and technology*, vol. 123, ss. 129-137.
- Chai, W., & Udén, P. (1998). An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 74, ss. 281-288.
- Chatterton, N. J., Watts, K. A., Jensen, K. B., Harrison, P. A., & Horton, W. H. (2006). Nonstructural carbohydrates in oat forage. *The Journal of Nutrition*, vol. 136(7), ss. 2111-2113.
- Ciavarella, T. A., Simpson, R. J., Dove, H., Leury, B. J., & Sims, I. M. (2000). Diurnal changes in the concentration of water-soluble carbohydrates in *Phalaris aquatica* L. pasture in spring, and the effect of short-term shading. *Australian Journal of Agricultural Research*, vol. 51(6), ss. 749-756.
- Coenen, M., Mößeler, A., & Vervuert, I. (2006). Fermentative gases in breath indicate that inulin and starch start to be degraded by microbial fermentation in the stomach and small intestine of the horse in contrast to pectin and cellulose. *The Journal of nutrition*, vol. 136(7), ss. 2108-2110.
- Coles, L. T., Moughan, P. J., & Darragh, A. J. (2005). In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 123, ss. 421-444.
- Cone, J. W., & van Gelder, A. H. (1999). Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 76(3-4), ss. 251-264.
- Cone, J. W., Van Gelder, A. H., & Valk, H. (1998). Prediction of nylon bag degradation characteristics of grass samples with the gas production technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 77(3), ss. 421-426.
- Čop, J., Lavrenčič, A., & Košmelj, K. (2009). Morphological development and nutritive value of herbage in five temperate grass species during primary growth: analysis of time dynamics. *Grass and forage science*, vol. 64(2), ss. 122-131.
- Costa, M. C., Silva, G., Ramos, R. V., Staempfli, H. R., Arroyo, L. G., Kim, P., & Weese, J. S. (2015). Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *The Veterinary Journal*, vol. 205(1), ss. 74-80.
- Delagarde, R., Peyraud, J. L., Delaby, L., & Faverdin, P. (2000). Vertical distribution of biomass, chemical composition and pepsin—cellulase digestibility in a perennial ryegrass sward: interaction with month of year, regrowth age and time of day. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 84(1-2), ss. 49-68.
- Dewar, R. C. (2000). A model of the coupling between respiration, active processes and passive transport. *Annals of Botany*, vol. 86(2), ss. 279-286
- Donaghy, D. J., & Fulkerson, W. J. (1997). The importance of water-soluble carbohydrate reserves on regrowth and root growth of *Lolium perenne* (L.). *Grass and Forage Science*, vol. 52(4), ss. 401-407.
- Dougal, K., Harris, P. A., Edwards, A., Pachebat, J. A., Blackmore, T. M., Worgan, H. J., & Newbold, C. J. (2012). A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. *FEMS microbiology ecology*, vol. 82(3), ss. 642-652.
- Egenvall, A., Nødtvedt, A., Penell, J., Gunnarsson, L., & Bonnett, B. N. (2009). Insurance data for research in companion animals: benefits and limitations. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 51(1), ss. 42.

- Ehleringer, J. R., & Cerling, T. E. (2002). C3 and C4 photosynthesis. *Encyclopedia of global environmental change*, vol. 2, ss. 186-190.
- Elghandour, M. M., Mellado, M., Kholif, A. E., Salem, A. Z., Barbabosa, A., Ballinas, S., Esquivel, A., & Odongo, N. E. (2016). Fecal gas production of ten common horse feeds supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 47, ss. 1-8.
- Elghandour, M. M., Khusro, A., Greiner, R., Salem, A. Z., de la Fuente, J. L., Márquez-Molina, O., Barbabosa-Pilego, A., & Jiménez, R. M. D. O. (2018). Horse Fecal Methane and Carbon Dioxide Production and Fermentation Kinetics Influenced by *Lactobacillus farciminis*-Supplemented Diet. *Journal of equine veterinary science*, vol. 62, ss. 98-101.
- Ersahince, A. C., & Kara, K. (2017). Nutrient composition and in vitro digestion parameters of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) herbage at different maturity stages in horse and ruminant. *Journal of Animal and Feed Sciences*, vol. 26(3), ss. 213-225.
- Fleurance, G., Duncan, P. & Mallevalud, B. (2001). Daily intake and the selection of feeding sites by horses in heterogeneous wet grasslands. *Animal Research*, vol. 50, ss. 149-156.
- Fogelfors, H. (2012). *Gräs i kulturlandskapet – lantbruk, park och trädgård*. Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet. ss. 27, 31, 35, 37, 45, 51.
- Franzan, B. C., Franco, T. W., Stefani, G., Pereira, M. M., Almeida, F. Q. D., & Silva, V. P. (2018). Equine fecal inoculum optimization in in vitro fermentation assays of dehydrated roughage. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 47.
- Frape, D. (2010). *Equine nutrition and feeding*. 4. uppl. Wiley-Blackwell, ss. 1-35, 327.
- Grimm, P., Philippeau, C., & Julliard, V. (2017). Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. *Animal*, vol. 11(7), ss. 1136-1145.
- Halling, M. (2012). *Vallväxter till slätter och bete samt grönfoderväxter*. Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet, ss. 4-5, 29-30, 34-35, 42, 44-45, 54.
- Harris, P., & Geor, R. J. (2009). Primer on dietary carbohydrates and utility of the glycemic index in equine nutrition. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, vol. 25(1), ss. 23-37.
- 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*, vol. 79(2), ss. 500-506.
- Hoffman, R. M. (2009). Carbohydrate metabolism and metabolic disorders in horses. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 38, ss. 270-276.
- Hoskin, S. O., & Gee, E. K. (2004). Feeding value of pasture for horses. *New Zealand Veterinary Journal*, vol. 52(6), ss. 332-341.
- Ince, J. C., Longland, A. C., Moore-Colyer, M. J. S., & Harris, P. A. (2014). In vitro degradation of grass fructan by equid gastrointestinal digesta. *Grass and forage science*, vol. 69(3), ss. 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*, vol. 54(5), ss. 2328-2340.
- Jordbruksverket (2017). *Hästar och anläggningar med häst 2016*. Jönköping: Jordbruksverket. Tillgänglig: <http://www.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/Amnesomraden/Statistik,%20fakta/Husdjur/JO24/JO24SM1701/JO24SM1701.pdf> [2020-01-23].
- 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*, vol. 31(8), ss. 488-497
- Kagan, I. A., Goodman, J. P., Seman, D. H., Lawrence, L. M., & Smith, S. R. (2019). Effects of Harvest Date, Sampling Time, and Cultivar on Total Phenolic Concentrations, Water-Soluble

- Carbohydrate Concentrations, and Phenolic Profiles of Selected Cool-Season Grasses in Central Kentucky. *Journal of equine veterinary science*, vol. 79, ss. 86-93.
- Larsson, K., & Bengtsson, S. (1983). *Bestämning av lättlösliga kolhydrater i växtmaterial*. Metodbeskrivning nr 22. Uppsala: Statens Lantbrukskemiska Laboratorium, ss. 22.
- Longland, A. C. (2012). Nutritional assessment of forage quality. I *Forages and grazing in horse nutrition*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, ss. 65-82.
- Longland, A. C., & Byrd, B. M. (2006). Pasture nonstructural carbohydrates and equine laminitis. *The Journal of nutrition*, vol. 136(7), ss. 2099-2102.
- Longland, A. C., Ince, J., & Harris, P. A. (2011). Estimation of pasture intake by ponies from live-weight change during six weeks at pasture. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 5(31), ss. 275-276.
- Longland, A. C., Ince, J. C., Moore-Colyer, M. J. S., & Harris, P. A. (2012). Degradation of grass and grass fructan by equine gastrointestinal digesta in vitro. I: *Forages and grazing in horse nutrition*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen. ss. 107-108.
- Lovett, D. K., Bortolozzo, A., Conaghan, P., O'Kiely, P., & O'Mara, F. P. (2004). In vitro total and methane gas production as influenced by rate of nitrogen application, season of harvest and perennial ryegrass cultivar. *Grass and Forage Science*, vol. 59(3), ss. 227-232.
- Lowman, R. S., Theodorou, M. K., & Cuddeford, D. (2002). The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. *Animal feed science and technology*, vol. 97(3-4), ss. 221-237.
- Macheboeuf, D., Jestin, M., Andrieu, J., & Martin-Rosset, W. (1998). Prediction of the organic matter digestibility of forages in horses by the gas test method. *BSAP Occasional Publication*, vol. 22, ss. 252-254.
- Mackenzie, D. J., & Wylam, C. B. (1957). Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. VIII.—Changes in carbohydrate composition during the growth of perennial rye-grass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 8(1), ss. 38-45.
- Mackie, R. I., & Wilkins, C. A. (1988). Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54(9), ss. 2155-2160.
- Martin-Rosset, W., Andrieu, J., Jestin, M., Macheboeuf, D., & Andueza, D. (2012). Prediction of organic matter digestibility of forages in horses using different chemical, biological and physical methods. In *Forages and grazing in horse nutrition* (ss. 83-95). Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. & Wilkinson, R. G. (2011). *Animal nutrition*. 7. uppl. Harlow: Pearson Education Limited. ss. 8-9, 16-30, 167-171, 186-187, 481-488, 500-501.
- McNaughton, S. J. (1983). Compensatory plant growth as a response to herbivory. *Oikos*, ss. 329-336.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, vol. 93(1), ss. 217-222.
- Menzies-Gow, N. J., Katz, L. M., Barker, K. J., Elliott, J., De Brauwere, M. N., Jarvis, N., Marr, C. M. & Pfeiffer, D. U. (2010). Epidemiological study of pasture-associated laminitis and concurrent risk factors in the South of England. *Veterinary Record*, vol. 167(18), ss. 690-694.
- Meyer, H., Ahlsvede, L., & Reinhardt, H. J. (1975). Studies on the duration of feeding, masticatory frequency and mincing of feed in horses. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, vol. 82, ss. 54-58.

- Milunovich, G. J., Burrell, P. C., Pollitt, C. C., Klieve, A. V., Blackall, L. L., Ouwkerk, D., Woodland, E., & Trott, D. J. (2008). Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *The ISME journal*, vol. 2(11), ss. 1089-1100.
- Miraglia, N., Bergero, D., Bassano, B., Tarantola, M., & Ladetto, G. (1999). Studies of apparent digestibility in horses and the use of internal markers. *Livestock Production Science*, vol. 60(1), ss. 21-25.
- Murata, Y., & Iyama, J. (1963). Studies on the photosynthesis of forage crops: II. Influence of air-temperature upon the photosynthesis of some forage and grain crops. *Japanese Journal of Crop Science*, vol. 31(4), ss. 315-322.
- 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*, vol. 94, ss. 771-782.
- Murray, J. A. M., 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*, vol. 151(3-4), ss. 306-311.
- Murray, J. A. M., Bice, R. K., & Moore-Colyer, M. J. (2010). The effect of particle size on the in vitro fermentation of different ratios of high-temperature dried lucerne and sugar beet pulp incubated with equine faecal inocula. *Animal feed science and technology*, vol. 162(1-2), ss. 47-57.
- Murray, J. A. M., Bloxham, C., Kilifay, J., Steveson, A., & Roberts, J. (2015). Equine nutrition: a survey of perceptions and practices of horse owners understanding a massive open online course in equine nutrition. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 25(6), ss. 520-517.
- Murray, J. 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*, vol. 187, ss. 98-103.
- Nelson, C. J., & Spollen, W. G. (1987). Fructans. *Physiologia Plantarum*, vol. 71(4), ss. 512-516.
- Pagan, J. D. (1998). Forages for horses: more than just filler. I: Pagan, J.D. (red.), *Advances in equine nutrition*. 1. uppl. Nottingham University Press. ss. 13-28.
- Patrick, J., C. Botha, F., & G. Birch, R. (2013). Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant biotechnology journal*, vol. 11(2), ss. 142-156.
- Philippeau, C., Varloud, M., & Julliand, V. (2014). Mobile bag starch prececal disappearance and postprandial glycemic response of four forms of barley in horses. *Journal of animal science*, vol. 92(5), ss. 2087-2093.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.C.M. (2003), Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology*, vol. 160(7), ss. 811-20.
- Rivero, M. J., Balocchi, O. A., Moscoso, C. J., Siebald, J. A., Neumann, F. L., Meyer, D., & Lee, M. R. (2019). Does the “high sugar” trait of perennial ryegrass cultivars express under temperate climate conditions?. *Grass and Forage Science*, vol. 74(3), ss. 496-508.
- Rücker, G. (1990). The effect of weather on the content of water soluble carbohydrates of grasses. In *Soil-grassland-animal relationships. Proceedings of 13th general meeting of the European Grassland Federation*, Banská Bystrica, Czechoslovakia, June 25-29, 1990, Vol. 2, ss. 170-173 Grassland Research Institute.
- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., & Givens, D. I. (2005). In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 123, ss. 9-30.
- Salem, S. E., Maddox, T. W., Berg, A., Antczak, P., Ketley, J. M., Williams, N. J., & Archer, D. C. (2018). Variation in faecal microbiota in a group of horses managed at pasture over a 12-month period. *Scientific reports*, vol. 8(1), ss. 1-10.

- Sanada, Y., Takai, T., & Yamada, T. (2007). Ecotypic variation of water-soluble carbohydrate concentration and winter hardiness in cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). *Euphytica*, vol. 153(1-2), ss. 267-280.
- Santos A.S., Cabo A.D., Lima S.M., Ferreira L.M., Rodrigues M.A.M. (2012) Fermentation parameters and total gas production of equine caecal and faecal inocula. I *Forages and grazing in horse nutrition*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen. ss. 55-58
- 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*, vol. 61(4), ss. 413-421.
- Smith, D. (1972) Carbohydrate reserves of grasses. I *The Biology and Utilization of Grasses* ed. McKell, C.M. and Younger, V.B. New York: Academic Press.
- Steward, A. & Hayes, R. (2011). Ryegrass breeding - balancing trait priorities. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, vol. 50, ss. 31-46.
- Suzuki, M. (1989). Fructans in forage grasses with varying degrees of coldhardiness. *Journal of Plant Physiology*, vol. 134(2), ss. 224-231.
- Särkijärvi, S., Sormunen-Cristian, R., Heikkilä, T., Rinne, M., & Saastamoinen, M. (2012a). Effect of grass species and cutting time on in vivo digestibility of silage by horses and sheep. *Livestock Science*, 144(3), 230-239.
- Särkijärvi, S., Niemeläinen, O., Sormunen-Cristian, R., & Saastamoinen, M. (2012b). Changes in chemical composition of different grass species and-mixtures in equine pasture during grazing season. In *Forages and grazing in horse nutrition* (ss. 45-48). Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Tas, B. M., Taweel, H. Z., Smit, H. J., Elgersma, A., Dijkstra, J., & Tamminga, S. (2006). Effects of perennial ryegrass cultivars on milk yield and nitrogen utilization in grazing dairy cows. *Journal of dairy science*, vol. 89(9), ss. 3494-3500.
- Thomas, H., & James, A. R. (1999). Partitioning of sugars in *Lolium perenne* (perennial ryegrass) during drought and on rewatering. *The New Phytologist*, vol. 142(2), ss. 295-305.
- Thomet, P., Stettier, M., & Hadorn, M. (2008). Manipulating pasture grass growth by nitrogen fertilization. I *Biodiversity and animal feed: future challenges for grassland production*. Proceedings of the 22nd General Meeting of the European Grassland Federation, Uppsala, Sweden, 9-12 June 2008 (ss. 329-331). Swedish University of Agricultural Sciences.
- 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*, vol. 57(4), ss. 322-328.
- Udén, P., & Van Soest, P. J. (1982). Comparative digestion of timothy (*Phleum pratense*) fibre by ruminants, equines and rabbits. *British Journal of Nutrition*, vol. 47(2), ss. 267-272.
- Udén, P., & Van Soest, P. J. (1984). Investigations of the in situ bag technique and a comparison of the fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. *Journal of Animal Science*, vol. 58(1), ss. 213-221.
- Van Soest P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods of dietary fiber, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, vol. 74, ss. 3583-3597.
- Virkajärvi P., Saarijärvi K., Rinne M., Saastamoinen M. (2012) Grass physiology and its relation to nutritive value in feeding horses. I: Saastamoinen M., Fradinho M.J., Santos A.S., Miraglia N. (eds) *Forages and grazing in horse nutrition*. *Forages and grazing in horse nutrition*, vol. 132. Wageningen Academic Publishers, Wageningen

- Voltaire, F., & Lelievre, F. (1997). Production, persistence, and water-soluble carbohydrate accumulation in 21 contrasting populations of *Dactylis glomerata* L. subjected to severe drought in the south of France. *Australian Journal of Agricultural Research*, vol. 48(7), ss. 933-944.
- Waite, R., & Boyd, J. (1953). The water-soluble carbohydrates of grasses. I.—Changes occurring during the normal life-cycle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 4(4), ss. 197-204.
- Williams, C. A., Kenny, L. B., & Burk, A. O. (2019). Effects of grazing system, season, and forage carbohydrates on glucose and insulin dynamics of the grazing horse. *Journal of animal science*, vol. 97(6), ss. 2541-2554.
- Wilman, D. (1980). Early spring and late autumn response to applied nitrogen in four grasses: 1. Yield, number of tillers and chemical composition. *The Journal of Agricultural Science*, vol. 94(2), ss. 425-442.
- Zhao, D., MacKown, C. T., Starks, P. J., & Kindiger, B. K. (2008). Interspecies variation of forage nutritive value and nonstructural carbohydrates in perennial cool-season grasses. *Agronomy Journal*, vol. 100(3), ss. 837-844.
- Zhu, J., Dong, C. H., & Zhu, J. K. (2007). Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current opinion in plant biology*, vol. 10(3), ss. 290-295.

Tack

Jag vill framföra ett stort tack till min handledare Cecilia Müller för ovärderlig hjälp och vägledning under arbetets gång. Jag vill även tacka vänner och familj som ställt upp och gjort min studieperiod möjlig.

Populärvetenskaplig sammanfattning

För många hästar utgör betesgräs en stor del av dieten under sommaren. Ett välskött och anpassat bete kan möta hästens näringsbehov under betessäsongen. Det har även ekonomiska fördelar för hästägaren och ger hästen möjlighet att uttrycka naturliga ätbeteenden och social interaktion. Gräs består till största delen av kolhydrater som bryts ned i olika delar av hästens mag-tarmkanal. Kolhydraterna delas in i strukturella och icke-strukturella, beroende på deras funktion i växten. Innehållet och balansen mellan de olika kolhydraterna förändras ständigt genom den upprepade avbetningen. Det påverkas även av bland annat gräsart och vilken mognadsfas gräset befinner sig i samt omgivande klimatfaktorer.

De strukturella kolhydraterna kallas även fibrer och är den största andelen kolhydrater i gräs. I vårt klimat utgörs de icke-strukturella kolhydraterna av socker och fruktaner. De kallas tillsammans också för lättlösliga kolhydrater. Att hålla hästar på bete kan medföra en risk för överkonsumtion av lättlösliga kolhydrater som kan leda till utveckling av bland annat fång. Innehållet av lättlösliga kolhydrater är en komplex process och fluktuerar både över dygnet och under betessäsongen. Halten av dessa är generellt högst under våren och under hösten när temperaturen sjunker. Det är för att gräset omfördelar socker mellan rötter och gröna växtdelar för att skydda sina celler från att skadas av frost.

Hos häst sker den huvudsakliga nedbrytningen av betesgräset i grovtarmen av hästens tarmflora som består av många olika mikroorganismer. Det är denna nedbrytning av fiber som avgör hur mycket energi från gräset hästen kan utnyttja och i samband med nedbrytningen bildas gaser. Om gräset innehåller stora mängder lättlösliga kolhydrater kan det orsaka störningar i tarmfloran som ökar risken för utveckling av kolik och fång. Denna nedbrytning är svår att mäta, men kan uppskattas laborativt genom att mäta volymen gas som produceras när gräsprover inkuberas tillsammans med en aktiv mikrobflora. Denna metod är relativt snabb, billig och kan utföras utan fistulerade försökshästar. I den här studien undersöktes innehållet av olika kolhydrater och gasproduktionen hos sex olika gräsarter som provtagits upprepade gånger under en betessäsong. De gräsarter som undersöktes var engelskt rajgräs, foderlost, hundäxing, rörsvingel, timotej och ängssvingel. Dessa odlades på samma plats och behandlades likadant för att kunna studera skillnader mellan arterna.

Resultatet visade att halten av de olika kolhydraterna berodde både på art och betestidpunkt. Alla gräsarter hade inte har samma respons på upprepat bete. Foderlost är en gräsart som inte verkade klara upprepat bete på grund av låg återväxt. Engelskt rajgräs hade ett högt innehåll av lättlösliga kolhydrater och lågt innehåll av fiber, medan hundäxing hade ett lågt innehåll av lättlösliga kolhydrater och högt

fiberinnehåll i relation till de övriga gräsarterna. Det betyder att hundäxing kan vara en lämplig gräsart om målet är ett betesgräs med lågt innehåll av socker eller fruktaner. Resultatet visade även att innehållet av lättlösliga kolhydrater och fiber hade en positiv respektive negativ korrelation med gasproduktionen. Det betyder att gräsarter med ett högt innehåll av lättlösliga kolhydrater kan orsaka större gasbildning, medan gräsarter med ett högre fiberinnehåll kan ge lägre gasbildning. Sammantaget medför detta att olika gräsarter kan ha en varierad lämplighet för olika kategorier av hästar, då en stor och snabb gasproduktion kan innebära grovtarmsstörningar.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.