



# Vallväxternas proteinfraktioner ur växtfysiologiskt perspektiv och betydelsen för idisslarens proteinförsörjning



Foto: Hanna Persson

Av  
Amelie Gottfridsson

Engelsk titel: Forage protein fractions with respect to crop physiology and the consequences for ruminant protein supply

Handledare: Torsten Eriksson

Inst. för husdjurens utfodring och vård

Examinator: Peter Udèn

---

Husdjursvetenskap - Examensarbete 15hp  
Litteraturstudie  
SLU, Uppsala 2009

## Sammanfattning

Vallfodret utgör basen i idisslarens foderstat. Innehåll av råprotein är relativt högt i vallfodret men idisslaren har svårt att till fullo utnyttja det. Idisslarens proteintillförsel består av mikrobprotein som syntetiserats i vommen och foderprotein som passerat onedbrutet genom vommen. Den sistnämnda proteinkällan är speciellt viktig för högvakastande djur. Problemet med vallfodret är att det innehåller en betydande andel råprotein som lätt fermenteras i vommen. Förutsättningarna för att proteinet som bryts ner i vommen ska bli mikrobprotein är att nedbrytningen inte går för snabbt och att tillräckligt med energi finns tillgänglig. För att kunna optimera avkastningen med så liten kväveförlust som möjligt måste man veta hur stor andel av råprotein som fermenteras i vommen och hur stor andel som passerar onedbruten förbi. I "The Cornell Net Carbohydrate and Protein System" (CNCPS) delas kolhydrater och protein in i underenheter utifrån tillgänglighet i vommen och smältbarhetsegenskaper efter vommen. Därmed kan halten foder som bryts ner i vommen, passagehastigheten av osmält foder till tarmarna, och mängden omsättbar energi och tillgängligt protein förutsägas.

Proteinerna i växter finns huvudsakligen representerade i form av enzymer. Kväveinnehållet är högst i ungt spätt gräs och ökar vid intensiv kvävegödsling. Andelen vömlöst kväve i färskt gräs ökar med ökande kväveinnehåll, vilket troligen beror på att andelen kväve i kloroplasterna och mitokondrierna är högre, och andelen förknippat med cellväggen lägre. Vid torkning av gräset orsakar växternas enzymer att andelen kvävekomponenter som bryts ner snabbt i vommen ökar, och vid ensilering blir en ännu större andel av kvävet lösligt. Då fuktiga förhållanden under torkning ökar proteolysen, är det viktigt med bra väder under torkningen för att minimera proteinnedbrytningen. Vid ensilering är dessutom en snabb pH-sänkning viktig. Om ensilaget förtorkas till en högre torrsubstanshalt minskar fermentationen av kvävekomponenter.

## Abstract

Forage is the main feed for ruminants. The content of crude protein is rather high in forage, but ruminants have difficulties in optimizing their protein metabolism. There are two sources from where the ruminant receives their protein. The first source is protein synthesised by microbes in the rumen, and the second source is feed protein which passes the rumen without fermentation. The rumen undegraded protein is particularly important for high yielding animals. Contributing factor to the suboptimal protein metabolism are the high levels of crude proteins in forage which are easily fermented in the rumen. The microbes can only maximize their utilization of ruminally degraded protein for microbial protein synthesis if the degradation isn't going to fast and if sufficient energy is available. To optimize the yield with as little loss of nitrogen as possible, it is most important to know how much of the crude protein which is fermented in the rumen and how much that passes unfermented. In "The Cornell Net Carbohydrate and Protein System" (CNCPS) the carbohydrates and proteins are divided into subunits due to their availability in the rumen and how well they digest after passing the rumen. The subunits makes it possible to predict to what degree the feed is degraded in the rumen, the rate of passage of undigested feed to the small intestines and the amount of metabolizable energy and available protein supplied to the animal.

Plant protein mainly consists of enzymes. The highest levels of nitrogen are found in young grass and the levels elevates even further with intensively nitrogen fertilization. There is a positive correlation between protein which is degraded in the rumen and levels of nitrogen in grass. This

probably depends on elevated levels of nitrogen in the chloroplasts and chondrosomes and a decreasing level of nitrogen associated with the cell wall. During the process of drying grass, plant enzymes alter the proteins in a way to make them more easily fermented in rumen, i.e. the crude protein solubility is increased. An even higher percentage soluble nitrogen is found in silage. It is of great importance with good drying conditions since a damp environment when drying the grass increase proteolysis. For silage a rapid lowering of pH is important. If silage is pre-wilted to a high dry matter less protein is degraded in the ensiling process.

## Introduktion

I Skandinavien finns mycket goda förutsättningar för att producera bra vallfoder, och vallfodret utgör också basen i våra idisslars foderstater. I mjölkproduktionen utgör vallfodret mer än hälften av totalfodret, i köttproduktionen utgör det över 70 %, och för fårproduktionen är siffran över 80 % (Martinsson, 2003). Mellan 75 och 90 % av kvävet i färskt gräs utgörs av protein, medan resten är icke-protein-kväve (Non protein nitrogen, NPN) bestående av peptider, fria aminosyror, amider, nukleotider etc. (Givens & Rulquin, 2004). När fodret lagras som hö eller ensilage bryts en del av proteinerna ned till NPN pga. växtenzym (Verbic et al., 1999). Växternas proteininnehåll och sammansättning påverkas dessutom av utvecklingsstadium, kvävegödsling, val av vallväxter, väderförhållanden etc. (Van Vuuren, 1993).

Protein som absorberas i tunntarmen är en blandning av mikrobiellt protein som har syntetiserats i vommen, och foderprotein som har undgått den mikrobiella nedbrytningen (Tamminga et al., 1991). Hos högavkastande djur är proteinet som bevarats onedbrutet genom vommen en mycket viktig proteinkälla (Schei, 2006). Gräs har ett relativt högt innehåll av råprotein, men idisslaren har svårt att till fullo utnyttja det pga. den relativt höga andelen vomnedbrytbart protein (Verbic et al. 1999). Snabb nedbrytning av kvävekomponenter i kombination med brist på energi leder till att det bildas stora mängder ammoniak som utsöndras via urinen som urea (Hedqvist, 2004). Kväveläckaget är ett miljöproblem då det bl.a. kan leda till övergödning av sjöar och vattendrag. Därför är det viktigt att en foderstat tillgodoser djurets kvävebehov utan att överstiga det (Lanzas et al. 2008). För att kunna optimera avkastningen med så liten kväveförlust som möjligt måste man kunna göra en bra bedömning av fodrets innehåll av vom-smältbart-protein och vom-osmältbart-protein. Sammansättningen i vallfodret kan variera avsevärt, och för att kunna bedöma proteinets vomnedbrytbarhet och mikrobiell proteinproduktion räcker det inte att veta fodrets råprotein- och energiinnehåll. Därför har det utvecklats olika system för att bättre kunna bedöma proteinets tillgänglighet för djuret. Ett sådant system är ”The Cornell Net Carbohydrate and Protein System” (CNCPS), i vilket råproteinet delas in i fem olika fraktioner utifrån tillgänglighet (Lanzas et al. 2008).

Syftet med denna litteraturstudie var att studera vallväxternas proteinfraktioner ur ett växtfysiologiskt perspektiv och vad som inverkar på proteinsammansättningen i vallfodret, samt hur detta i sin tur påverkar idisslaren proteinförsörjning.

## Idisslaren

Idisslarnas proteintillförsel består dels av foderprotein som undgått den mikrobiella nedbrytningen i vommen, och dels av mikrobprotein som syntetiserats i vommen (Tamminga et al., 1991). En liten andel är också endogent protein från matsmältningsenzymer och celler från

mag-tarmkanalen (Schei, 2006). Proteinerna absorberas i tunntarmen, och för att kunna förutsäga hur stor proteintillförseln hit är behövs information om förhållandet mellan foder- och mikrobprotein (Tamminga et al., 1991). Man behöver alltså veta i vilken utsträckning nedbrytning av foderprotein i vommen sker. Andelen protein som inte bryts ner i vommen beror huvudsakligen på hastigheten på nedbrytningen och uppehållstiden i förmagarna (Van Vuuren & Meijs, 1991). Nedbrytningshastigheten beror främst på proteinernas struktur och mikrobernas proteolytiska aktivitet, och uppehållstiden i förmagarna styrs till stor del av foderintag och partikelstorlek (Volden, 1999). Syntesen av mikrobprotein bestäms främst av tillgången på:

- förstadium som peptider, aminosyror, ammoniak, kolskelett, fosfor och svavel
- andra essentiella näringsämnen
- energi (Van Vuuren & Meijs, 1993).

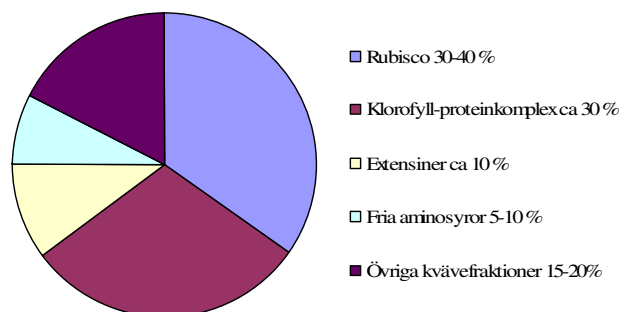
Aminosyror är byggmaterial i all proteinsyntes i kroppen, och skall täcka behovet för underhåll, tillväxt, reproduktion och laktation (Schei, 2006). Hos lågavkastande mjölkkor kan mikrobproteinet täcka över 80 % av proteinbehovet, medan siffran kan vara så låg som 50 % hos högavkastande kor (Schei, 2006). Proteinet som passerar onedbrutet genom vommen blir därmed viktigare när mjölkavkastningen ökar. Proteinkvaliteten med tanke på koncentrationen av essentiella aminosyror är lika viktig som mängden protein (Arambel & Coon, 1981). Idisslarens mikroorganismer kan syntetisera alla de essentiella aminosyror, men tillförsel av aminosyror i lämplig form via foderproteinet är nödvändig om idisslaren ska kunna avkasta maximalt (McDonald, 2002a). Aminosyrasammansättningen hos mikrobproteinet är relativt konstant, men skillnader i foderproteinet som passerar onedbrutet genom vommen påverkar sammansättningen av aminosyror som slutligen når tunntarmen (Arambel & Coon, 1981). Sammansättningen av aminosyror i foderproteinet kompletterar i många fall inte sammansättningen av aminosyror från mikrobproteinerna speciellt väl (Robinson, 1999). Brist på en nödvändig aminosyra kan leda till minskad avkastning.

Huvudkategorierna av vommikroorganismer är bakterier, protozoer och svampar (Volden, 1999). Bredden är stor i typ av proteolytiska enzymer, och den proteolytiska aktiviteten är främst extracellulär och associerad med cellväggen. Proteolysen inleds med en interaktion mellan mikroorganismerna och substratet. Proteinernas struktur bestämmer till stor del deras tillgänglighet för enzymerna (Volden, 1999). Vanligen är lösliga proteiner känsligare för nedbrytning än olösliga proteiner (Wallace et al., 1997). Närvaro av t.ex. mycket disulfidbindningar gör proteinet mer motståndskraftigt mot sönderdelning, pga. att tillgängligheten för proteolytiska enzymer blir mindre (Volden, 1999). Proteolysen ger upphov till oligopeptider, som i sin tur bryts ner till dipeptider och aminosyror. Peptiderna och aminosyror tas sedan upp genom mikrobernas cellmembran. De absorberade peptiderna bryts intracellulärt ner till aminosyror, vilka blir till mikrobprotein eller omvandlas till ammoniak. Omvandlingen av aminosyror till mikrobprotein är energiberende, och om energitillgången är begränsad leder peptidnedbrytningen till en mycket stor ammoniakproduktion (Volden, 1999; Hedqvist, 2004). Ammoniak som inte integreras i mikrobprotein absorberas och utsöndras i urinen främst i form av urea (Van Vuuren et al., 1993; Hedqvist, 2004). Kväveläcketaget kan bl.a. leda till övergödning av sjöar och vattendrag.

## **Kvävefraktionerna i växter**

Omkring 75 till 90 % av kvävet i gräs utgörs av protein (Ohshima & McDonald, 1978). Proteiner

är uppbyggda av en eller flera polypeptider och eventuellt andra ämnen (McDonald et al., 2002a). Polypeptiderna i sin tur byggs upp av aminosyror. Över 200 olika aminosyror har isolerats från biologiska material, men endast 20 av dessa hittas vanligen som komponenter i proteiner. Polypeptider i växtceller skiljer sig avsevärt åt i längd, och vanligen innehåller de mellan 40 till 1000 aminosyror (McDonald et al. 2002a). De vanligaste aminosyrorna i gräs är asparagin, asparaginsyra, glutaminsyra, glutamin och leucin, medan andelarna histidin, cystein och metionin är relativt låga (Van Vuuren, 1993). Växtproteinerna kan klassificeras i två grupper; dels proteinerna i blad och stjälkar, och dels lagringsproteinerna i frön (Van Soest, 1994). Den första gruppen representerar det aktivt omsättbara proteinet i växten, medan den senare är reservprotein. Ribulos-1,5-bisfosfat-karboxylas (Rubisco) är det vanligaste proteinet i alla gröna blad (Mangan, 1982). Bladproteinerna kan delas in i cytoplasma- och kloroplastproteiner, nukleoproteiner i kärnan, och extensinproteiner i cellväggarna. De cytoplasmatiske proteinerna och kloroplastproteinerna är till stora delar lösliga i växtcellinnehållet, men fälls ut vid mild torkning eller värme. Kloroplasterna står för 75 % av de gröna bladens proteininnehåll (Mangan, 1982). Proteinerna i växterna kan bestå av upp till hälften av olösliga proteiner (Lyttleton, 1973). En del av de olösliga proteinerna finns i kloroplastmembranerna, och en del är förenat med cellulosan i de primära cellväggarna som extensiner (Van Vuuren, 1993). De olösliga proteinerna i kloroplastmembranerna utgör ungefär 40 % av kloroplastproteinerna, och de finns representerade som olika klorofyll-protein-komplex. Extensinerna är troligen bundna till polysackarider i växtens cellvägg och återfinns vid foderanalys i NDF-fraktionen (Neutral Detergent Fiber) (Van Soest, 1994). Extensinerna spelar en viktig roll i kontrollen av cellväggens utveckling. De är starkt basiska glykoproteiner, och innehåller mycket av aminosyrorna hydroxyprolin, lysin, serin och tyrosin, och monosackariderna arabinos och galaktos (Mangan, 1982). Figur 1 visar fördelningen mellan de olika kvävefraktionerna i växterna (blad och strå/stjälk).



Figur 1. De olika kvävefraktionernas andelar av de gröna växternas totala kväveinnehåll (Van Vuuren, 1993).

I växterna finns också ett stort antal icke-protein-kväve-föreningar (NPN), med en stor variation i funktioner (Morot-Gaudry et al., 2001). Vissa NPN-föreningar är övergångsstadium av proteinsyntesen, och andra är resultatet av nedbrytning av proteiner och nukleinsyror. NPN består till stora delar av fria aminosyror och amider (Ohshima & McDonald, 1978). De fria aminosyrorna står för mellan 4 och 32 % av vallfodrets totala kväveinnehåll, och de vanligast förekommande aminosyrorna är asparagin, glutamin, asparaginsyra, glutaminsyra, serin, alanin och g-aminobutyrat (Mangan, 1982). Även mindre koncentrationer av aminer, ureider, nukleotider, klorofyll, och små peptider finns representerade (Ohshima & McDonald, 1978).

Beroende på bl.a. art och skötsel kan vallfodret innehålla nitrat i olika koncentrationer. Mängden ammonium-kväve understiger 1 % av kvävet (Ohshima & McDonald, 1978).

## Proteinfraktionering vid foderanalys

För att djuren ska ge bra avkastning och produktionen bli ekonomiskt och miljömässigt hållbar behöver fodrets innehåll av energi och protein analyseras. Beståndsdelarna i fodret är kolhydrater, proteiner, fett, aska och vatten. I över 150 år har man använt sig av Weende-systemet (råanalys) för att mäta innehållet av dessa komponenter som växttråd, råfett, torrs substans, totalkväve och aska (Fox et al., 2003). Restmängden som blir kvar efter de andra analyserna är kvävefria extraktivämnen (NFE). Proteininnehållet beräknas utifrån kväveinnehållet, och beräkningen innebär två antaganden – dels att allt kväve härrör från protein, och dels att allt protein innehåller 160 g N/kg (McDonald et al., 2002c). Detta innebär att råproteininnehållet beräknas som  $6,25 \times$  totalkväveinnehållet. Råanalysen innebär en grov uppdelning av växtens kemiska beståndsdelar och tar inte hänsyn till deras nedbrytningsegenskaper. Därför utvecklades "The Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) (Sniffen et al., 1992). CNCPS tar hänsyn till effekterna av variationerna i fodrets proteinfraktioner (Lanzas et al., 2008). Med detta system kan man förutsäga halten foder som bryts ner i vommen, passagehastigheten av osmält foder till tarmarna, och mängden omsättbar energi och tillgängligt protein (Sniffen et al., 1992). Kolhydrater och protein delas in i underenheter utifrån tillgänglighet i vommen och smältbarhetsegenskaper efter vommen.

I CNCPS delas råproteinet in i fem olika fraktioner beroende på löslighet i utfällningsmedel, buffertar och detergenter (tabell 1) (Sniffen et al., 1992). Fraktion A är icke-protein-kväve (NPN), fraktion B är verkligt protein, och fraktion C är otillgängligt protein. Fraktion B delas vidare in i de tre underfraktionerna B1, B2 och B3 beroende på vomttillgänglighet (Lanzas et al., 2008). Fraktion A är kväve lösligt i buffert som inte fälls ut av proteinutfällande agenter som TCA (triklorättiksyra) (Sniffen et al., 1992). Fraktion B1 är snabbt nedbrytbart protein, vilket är TCA-fällbart protein från det buffertlösliga proteinet. Fraktion B3 är protein som bryts ner långsamt. Det är olösligt i neutral detergent (ND-lösning) men lösligt i sur detergent (AD-lösning). Fraktion C är kväve olösligt i AD-lösning. Fraktion B2 har en medelnedbrytningshastighet och är det kvarvarande proteinet.

Tabell 1. De olika kvävefraktionernas löslighet i buffert och detergenter enligt CNCPS-systemet (Sniffen et al., 1992)

Lösning	Löslighet	Fraktion
Buffertlösning	löslig	A, B1
	olöslig	B2, B3, C
Neutral detergent	löslig	A, B1, B2
	olöslig	B3, C
Sur detergent	löslig	A, B1, B2, B3
	olöslig	C

Råproteinet i färskt gräs utgörs till 20-30 % av fraktion A, 60-70 % av fraktion B och 4-15 % av fraktion C (Van Soest, 1994). Fraktion A innehåller NPN-föreningar som peptider, fria aminosyror, ammoniak, amider, aminer, ureider, nukleotider och nitrat. I princip allt lösligt råprotein i lagrat vallfoder finns i form av NPN (Sniffen et al., 1992). Det omvandlas snabbt i vommen till ammoniak. Fraktion B1 bryts också snabbt ned i vommen, men utgör bara ungefär 5 % av det totala innehållet av lösligt råprotein i skördat vallfoder. I färskt gräs däremot finns huvuddelen av det lösliga råproteinet i form av fraktion B1 (Van Soest, 1994). Fraktion B2 bryts delvis ner i vommen, medan en del undkommer. Proportionen däremellan beror på digestion- och passagehastighet (Sniffen et al., 1992). Fraktion B3 utgörs av extensinerna, dvs. protein bundet till cellväggen (Van Soest, 1994). De bryts därför ner långsamt i vommen vilket medför att en stor andel inte tas upp i vommen. Vallfoder innehåller en betydande andel av denna fraktion (Sniffen et al., 1992). Fraktion C är protein som är otillgängligt för vommikroberna. Det innehåller protein förknippat med lignin, tannin-protein-komplex och Maillardprodukter, vilka har hög motståndskraft mot mikrobernas och djurens egna enzymer (Krishnamoorthy et al., 1982). En Maillardreaktion är en reaktion som kan inträffa när proteinerna utsätts för värme i närvaro av kolhydrater (McDonald, 1982). Reaktionen innebär bl.a. att en kondensering sker mellan karbonylgruppen hos det reducerande sockret och den fria aminogruppen hos en aminosyra eller protein. Reaktionen resulterar i att fodret blir brunfärgat. Temperaturen har stort inflytande på reaktionshastigheten, och vid 70°C går reaktionen 9000 gånger snabbare än vid 10°C. När det gäller tanniner så är innehållet relativt högt i t.ex. käringtand (Hedqvist, 2004). Vid intag av växter som innehåller tanniner bildas komplex mellan proteinerna och tanninerna. Dessa komplex undgår delvis nedbrytning i vommen pga. att de är relativt stabila i de pH-värden som finns där. I löpmagen är pH-värdet lägre, vilket gör att komplexet till stor del spjälkas, så när de når tunntarmen kommer enzymerna åt att spjälka proteinet. Dock kan proteinet åter binda till det frikopplade tanninet om inte spjälkningen sker tillräckligt snabbt. De protein-tannin-komplex som aldrig löstes upp i löpmagen eller som återbildades i tunntarmen utsöndras med träcken.

Systemet att dela in råproteinet i fem olika fraktioner började användas i början av 80-talet (Lanzas et al. 2008). Sedan dess har CNCPS-systemet utvecklats och lanserats i flera olika versioner.

## **Vad har protein och icke-protein-kväve för funktioner i växten?**

Proteiner finns i alla levande celler, och i växterna finns de huvudsakligen representerade i form av enzymer (Van Vuuren, 1993). Proteiner ger även vävnaderna styvhet (McDonald et al., 2002a). Rubisco är det vanligaste proteinet i de gröna bladen och det är det första enzymet i Calvin-cykeln, vilket innebär att det är involverat i koldioxidfixeringen i C3-växter (Mangan, 1982). I Sverige är de flesta växter långdagsväxter, dvs. de har C3-metabolism, vilket innebär att vid hög fotosyntetisk aktivitet reagerar 1 mol Rubisco med 1 mol CO<sub>2</sub>, vilket ger 2 mol 3-fosfoglycerat som via metaboliska vägar ger upphov till socker, aminosyror etc. Rubisco har även ribulos-1,5-bisfosfat-oxygenasaktivitet, vilket gör att det även står för de första stegen i fotorespirationen. Fria aminosyror är inblandade i transporten av kväve från rötter och gamla blad till delar som nya blad, frön och frukt (Morot-Gaudry et al., 2001). Aminosyrorna är även inblandade i produktionen av t.ex. alkaloider och fenolsyror. NPN-föreningar är förstadium i syntesen av klorofyll och enzymkofaktorer som biotin, coenzym A och thiamin-pyrofosfat (Morot-Gaudry et al., 2001).

## Växternas upptag av kväve

Växterna tar upp kväve antingen i form av nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) eller ammoniumjoner (Pilbeam & Kirkby 1992). Nitratjoner förekommer vanligen i högst koncentration i jorden och är i de flesta fall den viktigaste kvävekällan för växter. Detta trots att upptaget av nitratjoner är metaboliskt kostsammare än upptaget av ammoniumjoner. Nitratjonerna reduceras dessutom till ammonium efter upptaget. I sura jordar dominerar dock ammoniumupptaget pga. att nitrifikationen till stora delar inhiberas (Pilbeam & Kirkby, 1992).

Växter kan inte själva fixera luftens kväve, men vissa växter lever i symbios med kvävefixerande bakterier (Morot-Gaudry & Touraine 2001). Bakterier av bl.a. familjen Rhizobiaceae sitter bundna till knölar på växternas rötter. De omvandlar  $\text{N}_2$  till  $\text{NH}_3$  som växten använder som kvävekälla. I gengäld förser växten bakterierna med kol. Detta symbiosförhållande hittas främst hos baljväxter.

Det oorganiska kvävet assimileras till aminosyror i en energikrävande process (Fischer et al., 1998). Omvandlingen av ammonium sker i rötterna. Nitratassimileringen sker däremot antingen i rötterna eller i fullt utvecklade blad, beroende på art och yttre omständigheter. Transport till bladen sker via växtens xylem, en ledningsvävnad som transporterar främst vatten och oorganiska ämnen. Överskott av aminosyror kan exporteras från bladen via floem, en ledningsvävnad som används för transport av organiska ämnen. Transporten via xylem sker extracellulärt och via floem intracellulärt. Exempel på organ som kräver tillförsel av aminosyror är vävnader under utveckling, meristem (celldelningszon), och reproduktionsorgan (Ortiz-Lopez, 2000). Aminosyrorna i xylem och floem är främst amider som glutamin och asparagin, och sura aminosyror som glutamat och aspartat (Fischer et al. 1998). Aminosyrasammansättningen i floem och xylem skiljer sig inte nämnvärt åt, men koncentrationen är lägre i xylem än i floem. Aminosyrornas transport mellan olika organ kräver närvaro av aminosyratransportörer i plasmamembranen (Fischer et al., 1998; Ortiz-Lopez, 2000).

## Vallväxternas proteininnehåll och sammansättning

### Utvecklingsstadium

Omkring 75 till 90 % av kvävet i gräs utgörs vanligen av protein (Ohshima & McDonald, 1978). Kvävet i ett mycket spätt gräs däremot består till en betydande andel av NPN (Mangan, 1982). Därmed karaktäriseras kvävet i ett ungt gräs av hög vomsmältbarhet (Van Vuuren et al. 1991). I ett tidigt utvecklingskede ökar halten kloroplastprotein märkbart (Van Vuuren, 1993). Kvävetillförseln sker i form av  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  och amino-amidkväve från vävnader som rötter och gamla blad, och från jorden. Den totala andelen kväve av torrsubstansen i italienskt rajgräs ökar de första veckorna efter första skörd, men därefter sjunker andelen kväve (Van Vuuren, 1993). När gräset växer ökar behovet av fibervävnad för att behålla strukturen, och därmed ökar andelen av de strukturella kolhydraterna; cellulosa och hemicellulosa, och andelen vattenlösliga kolhydrater minskar. Även innehållet av lignin ökar (McDonald et al., 2002b). Resultatet blir att andelen NDF ökar och även andelen NDF som lignifieras (Balde et al., 1993). Detta innebär att i takt med att gräset utvecklas så minskar gräsets smältbarhet. Cytoplasmaandelen i cellerna minskar också, vilket medför att dennas innehåll av proteiner, lipider, lösliga kolhydrater, och



lösliga mineraler minskar (Sullivan, 1973). När rajgräs utvecklas ökar andelen strå från 5 till över 60 %, och andelen blad minskar därmed (Ulyatt, 1981). Andelen strukturella kolhydrater ökar från 37 % till 52 % vid axgång, och innehållet av råprotein minskar från ungefär 19 % till 10 % av torrsubstansen. I en studie gjord av Balde et al. (1993) undersöktes bl.a. hur råproteinets vomsmältbarhet i lusern och hundäxing påverkades av utvecklingsstadium. I lusernen minskade andelen vomnedbrutet råprotein från ca 85 till 80 % med ökande utvecklingsgrad. För hundäxingen skedde en minskning från ungefär 78 till 70 %. Huvuddelen av minskningen i nedbrytbarhet kunde förklaras av en ökning av den vomsmältbara C-fraktionen. I en studie gjord av Rinne et al. (1997) fann man att förhållandet mellan de olika proteinfraktionerna i CNCPS-systemet inte förändrades märkbart under timotejs utveckling. Andelen fraktion C ökade i takt med ökningen av cellväggsinnehåll, men den utgjorde dock en mindre andel av det totala proteininnehållet. Bosch et al. (1994) fann i en studie att andelen råprotein som undkom nedbrytning i vommen ökade vid en ökning av innehållet av cellväggar. Enligt Van Vuuren et al. (1991) minskar andelen protein som bryts ner i vommen med ökande utvecklingsstadium hos vallfodret, vilket skulle innebära att andelen protein som når tunntarmen skulle öka. Dock uppger samma källa också att råproteininnehållet minskar med ökande utvecklingsstadium och att det i slutändan skulle medföra att mängden råprotein som når tunntarmen per kilo foder antagligen inte förändras speciellt mycket. Bosch et al. (1994) har uppfattningen att det inte är ett bra alternativ att utfodra med ett ensilage med hög andel cellväggar, eftersom foderintaget då skulle minska och de endogena proteinförlusterna öka, vilket troligen skulle leda till mindre proteinnedbrytning i tunntarmen och ett mindre effektivt utnyttjande av aminosyror.

I tidigare nämnda studie av Balde et al. minskade innehållet av råprotein i takt med ökande utvecklingsstadium, men det skedde ingen förändring i den relativa andelen av individuella aminosyror. Enligt Mangan (1982) utgörs bladens proteiner främst av enzymer som används i växtens metabola processer. Enligt samma källa är bladproteinets sammansättning och proportioner relativt konstanta pga. de fortsatta metaboliska funktionerna, även om mängden protein späds ut i vallfodret i takt med att det utvecklas. Denna uppfattning stämmer även med Wilson och Tilleys undersökning (1965). Fem olika grässlåg och sex prover från lusern undersöktes vid olika utvecklingsstadium och de fann att aminosyrasammansättningen var ungefär den samma oavsett när proverna togs. Dock finns det studier som tvärtemot dessa resultat tyder på ändrad aminosyrasammansättning med ökande utvecklingsstadium hos hö av lusern, rödklöver, timotej och hundäxing (Kolousek & Coulson, 1955).

## **Kvävegödsling**

Det är mycket vanligt att använda intensiv kvävegödsling för att öka avkastningen vid en viss tidpunkt eller minska antalet dagar fram till skörd (Van Vuuren, 1993). Gödslingen resulterar i att vallfodrets innehåll av totalkväve ökar. Andelen vomlösligt kväve i färskt gräs ökar med ökande kväveinnehåll, vilket antagligen beror på att andelen kväve i kloroplasterna och mitokondrierna är högre, och andelen kväve förknippat med cellväggen är lägre (Tamminga et al., 1991). Även Van Vuuren et al. (1993) uppger att intensivt gödslat gräs har en hög andel vomnedbrytbart råprotein som lätt fermenteras till VFA och NH<sub>3</sub>. I en studie utförd av Goswami & Willcox (1969) studerade man hur kvävefraktionerna i rajgräs som gödslats med olika mycket kväve skiljde sig åt vid samma utvecklingsstadium. En ökning av totalkväveinnehållet ledde då även till en ökning i proteinkväveinnehåll, men proteinets andel av det totala innehållet av kväve minskade.

Även väderförhållanden påverkar växtens kväveinnehåll (Van Vuuren, 1993). Hög nederbörd leder till kväveläckage från jorden och därmed påverkas växtens kväveupptag från jorden negativt. Solstrålning stimulerar fotosyntesen vilket leder till en ökning av kolhydratinnehåll och därmed en utspädning av innehållet av råprotein.

### **Torkning och ensilering**

När grödan torkar på åkern fortsätter den att respirera vilket leder till oxidering av socker (McDonald, 1982). Samtidigt ökar andelen lösliga kvävekomponenter pga. proteasaktivitet hos främst växtzymer (Givens & Rulquin, 2004). Huvudprodukterna från proteinnedbrytningen är peptider, fria aminosyror och amider (Kemble & MacPherson, 1954). Tamminga et al. (1991) uppger att bra väderförhållanden under torkning till stora delar förhindrar aktivitet av växtproteaser. I en studie gjord på blad av rajgräs (MacPherson, 1952) skedde en minskning på 16,5 % i innehållet av äkta protein efter torkning i laboratoriet i 24 timmar. Ytterligare torkning i 24 timmar ökade inte proteinnedbrytningen. Däremot om torkningen skedde under fuktiga förhållanden ökade proteinnedbrytningen från ca 24 % efter 24 timmar till 33 % efter 48 timmar. Det finns dock nyare studier som visar på att proteolysen fortsätter med längre torkperiod även under normala torkförhållanden (McDonald et al., 1991). Även denna källa uppger att proteolysen ökar under fuktiga förhållanden. Blagoveshensky et al. (1979) genomförde en undersökning på stjälkar och blad av rödklöver. I den studien hade en ytterligare minskning av proteininnehållet skett även efter 48 timmar. Här ökade andelen fria aminosyror i bladen i upp till 48 timmar och en ungefärlig ts-halt av 40 %. Efter 72 timmar ökade ts-halten radikalt, och en minskning i innehållet av fria aminosyror inträffade. Mangan och Harrison (1991) genomförde en studie på halten Rubisco i rajgräs och lusern. Vid snabb torkning under 24 timmar skedde ingen signifikant minskning av halten Rubisco varken i rajgräset eller lusernen. I en vidare undersökning förlängdes torktiden för lusern till tre dagar pga. sämre väder. Resultatet blev att 70 % av innehållet av Rubisco gick förlorat.

Vid ensilering sker en omfattande förändring av kvävefraktionerna pga. aktivitet hos både växtzymer och mikrobiella enzymer (Ohshima & McDonald, 1978). Andelen totalkväve som bryts ner snabbt i vommen är betydligt större i ensilage än i både färskt gräs och hö (Tamminga et al., 1991; Verbic et al., 1999). Huvudanledningen är att en stor andel kväve blir lösligt vid ensileringsprocessen. Efter att gräset har packats i silon eller i balar fortsätter proteolysen, och inom ett dygn kan proteinandelen av det totala kvävet ha sjunkit från 80 till 60 % (Givens & Rulquin, 2004). I början av ensileringsprocessen står växtproteaser för huvuddelen av den proteolytiska aktiviteten. Resultatet av proteolysen blir aminosyror och ammoniak. Även i ett ensilage med lyckad ensilering kan hälften av proteinet brytas ned (McDonald, 1973). Tabell 2 är ett utdrag ur en studie av Hedqvist och Udén (2006) där förändringen i halten buffertlösligt kväve (BSN) och dess olika komponenter kan ses för rajgräs, vitklöver och rödklöver. Det buffertlösliga kvävet består av fraktion A och B1, dvs. NPN och protein som bryts ner snabbt i vommen (Sniffen et al., 1992). Baljväxter innehåller vanligen mer råprotein än gräs (McDonald, 2002b).

Tabell 2. Det totala innehållet av kväve, buffertlösligt kväve (BSN), och BSN-beståndsdelar i färskt gräs (G) och ensilage (E) av rajgräs, vitklöver och rödklöver (Hedqvist & Udén, 2006)

	Totalkväve (g/kg ts)		BSN (g/kg N)		Protein N (g/kg BSN)		Peptid N (g/kg BSN)		Aminosyra N (g/kg BSN)		NH <sub>3</sub> (g/kg BSN)	
	G	E	G	E	G	E	G	E	G	E	G	E
Rajgräs	23	21	372	668	363	13	396	-	96	367	7	93
Vitklöver	40	41	361	509	238	34	325	-	113	380	27	126
Rödklöver	34	30	390	510	189	71	325	-	106	348	18	145

Hur snabbt aktiviteten hos växtenzymerna minskar är källorna inte eniga om. Enligt Ohshima & McDonald (1978) minskar aktiviteten snabbt, och inom två till fem dagar är nivåerna omätbara. McDonald (1982) uppger att aktiviteten minskar i takt med att pH faller. Det finns dock studier där enzymaktiviteten fortsätter betydligt längre än vad Ohshima & McDonald uppger. Ett exempel är en studie av Guo et al. (2007), där växtenzymerna fortfarande är aktiva efter 21 dagar. Användning av olika ensilerings tillsatser kan minska andelen protein som bryts ner till NPN. Några exempel på medel som används är myrsyra, formaldehyd och tanniner (Guo et al., 2007). Kemble & Mcpherson (1954) uppger att nedbrytningen av protein inte verkar vara selektiv, då det kvarvarande proteinet har likadan aminosyrasammansättning som det ursprungliga proteinet. I en studie av Givens & Rulquins (2004) ledde däremot ensileringen till en ökad koncentration av alanin, methionin och andra grenade aminosyror, och en minskning av enkla aminosyror som arginin. Vidare nedbrytning av aminosyror till ammoniak sker främst pga. mikrobiell aktivitet, även om det finns några växtenzymerna som kan sönderdela vissa aminosyror (Givens & Rulquin, 2004). Om pH-sänkningen sker snabbt under ensileringen undviks en märkbar nedbrytning av aminosyror (McDonald, 1973). Mjölksyrabakterier är i normalfallet inte proteolytiska. Om ett stabilt pH däremot inte uppnås i ensilaget kan klostridier växa till, vilka fermenterar aminosyror till bl.a. ättiksyra, aminer och ammoniak (McDonald, 1973).

I en studie gjord av Rinne et al. (1997) minskade NDF-innehållet i ensilaget under ensileringsprocessen. Myrsyra var tillsatt, och det tillsammans med mikrobiella processer kan ha hydrolyserat NDF (McDonald et al., 1991). Nedbrytningen av NDF var större i gräs i ett tidigt utvecklingsstadium än i ett sent. Minskningen i NDF-innehåll inträffade framför allt via nedbrytning av NDF-bundet kväve, dvs. fraktion B3.

Vid torkning av gräset ökar det osmotiska trycket vilket inhiberar mikrobiell aktivitet (Tamminga et al., 1991). Om ensilaget förtorkas så det får en högre ts-halt leder det till att fermentationen av kvävekomponenter minskar (Merchen & Satter, 1983; Tamminga et al., 1991). Dock innehåller även ett ensilage med en ts-halt på över 60 % betydligt större andel lösligt kväve än färskt gräs och hö (Tamminga et al., 1991). Fermentationen som sker i ensilaget minskar även tillgången på energi för vommens mikrober, eftersom mjölksyrabakterier fermenterar de vattenlösliga kolhydraterna till organiska syror (Givens & Rulquin, 2004). Det finns flera studier som visar på att torkning av gräset till ett torrare ensilage eller till hö leder till en högre mikrobproteinproduktion (Narasimhalu et al., 1989; Verbic et al., 1999). Dock finns det även några studier som tyder på att hö och torrare ensilage skulle ge upphov till mindre mikrobprotein (Jaakkola & Huhtanen, 1993; Verbic et al., 1999).

## Diskussion

Gräs har ett relativt högt innehåll av råprotein, men idisslarna har svårt att till fullo utnyttja det (Verbic et al., 1999). Huvudorsaken är att vallfodret innehåller en betydande andel råprotein som lätt bryts ned i vommen (Van Vuuren et al., 1991). Detta leder till kväveläckage då de stora mängderna ammoniak som bildas i vommen utsöndras i form av urea (Van Vuuren et al., 1993; Hedqvist, 2004). En högvakastande mjölkko klarar sig inte heller på bara mikrobprotein. Schei (2006) uppger att för en högvakastande mjölkko kan mikrobproteinet stå för så lite som 50 % av proteinbehovet.

Speciellt kvävet i ungt gräs karaktäriseras av hög vomfermentation (Van Vuuren et al., 1991). Detta beror enligt Mangan (1982) på en hög andel NPN. Studier som den av Balde et al. (1993), visar att andelen råprotein som bryts ner i vommen minskar med ökande utvecklingsgrad hos vallfodret. I den studien hängde minskningen i vomnedbrutet protein samman med en ökning av fraktion C. Som nämnts tidigare består denna fraktion av protein förknippat med bl.a. lignin (Krishnamoorthy et al., 1982). I studien av Bosch et al. (1994) fann man att andelen råprotein som inte bröts ned i vommen ökade när andelen cellväggar ökade. Fraktion B3 utgörs av extensinerna, vilka är förknippade med cellväggen (Van Soest, 1994). Studierna av Balde et al. och Bosch et al. stämmer väl överens med det McDonald et al. (2002) uppger; gräsets behov av fibervävnad ökar när gräset växer, vilket gör att andelen strukturella kolhydrater och lignin ökar. Uppgifterna från Ulyatt (1981) styrker detta. Han uppger att andelen strå i rajgräs vid utveckling ökar från 5 till över 60 %. Baserat på denna kunskap kan det tyckas som att utfodring av ett vallfoder skördat i ett sent utvecklingsstadium vore ett sätt att komma tillrätta med problemet eftersom andelen foderprotein som då skulle nå tunntarmen skulle öka (Van Vuuren et al., 1991). Dock uppger samma källa att eftersom innehållet av råprotein i vallfodret minskar med ökande utvecklingsstadium skulle en sådan utfodringsstrategi antagligen leda till att en oförändrad mängd råprotein per kilo ts foder i slutändan nådde tunntarmen. Enligt Bosch et al. (1994) är det ingen bra idé att utfodra med vallfoder skördat sent i utvecklingen, då foderintaget skulle minska och de endogena proteinförlusterna öka. Dessutom påverkas inte bara proteinerna av skörd i ett sent utvecklingsstadium, utan pga. den ökande halten lignin så minskar fodrets smältbarhet överhuvudtaget (McDonald et al., 2002b). Som nämnts tidigare så är omvandlingen av aminosyror till mikrobprotein energiberoende (Hedqvist, 2004). Det innebär att lättillgänglig energi är nödvändig för att fodrets innehåll av vomnedbrytbart råprotein ska kunna tas tillvara och inte utsöndras i form av urea. Om man vägar ihop alla faktorer så är det i slutändan alltså ingen speciellt bra idé att försöka lösa problemet genom att utfodra med ett vallfoder i sent utvecklingsstadium.

Intensiv kvävegödning innebär att vallfodrets innehåll av totalkväve ökar (Van Vuuren, 1993). Ökande kväveinnehåll leder även till ökad andel vomnedbrytbart kväve, vilket troligen hänger samman med att andelen kväve förknippat med cellväggen är lägre och andelen kväve i kloroplasterna och mitokondrierna är högre (Tamminga et al., 1991). Utifrån detta kan det nog vara en bra idé att tänka över mängden kvävegödning som används. Det är även en kostnadsfråga att använda stora mängder gödning, så en väl genomtänkt plan när det gäller mängden som används, gynnar både miljön, produktionen och plånboken.

En stor andel av året utfodras idisslarna med lagrat vallfoder. Vid torkningen orsakar växtenzymernas proteasaktivitet att andelen lösliga kvävekomponenter ökar (Givens & Rulquin,

2004). Hur lång tid proteolysen håller på är lite oklart, då olika källor uppger olika tidsintervall (Macpherson, 1952; McDonald et al., 1991; Blagoveshensky et al., 1978). De är dock överens om att torkning under fuktiga förhållanden leder till ökad proteolys. Av det borde slutsatsen kunna dras att väderförhållandena under torkning är av yttersta vikt för att bevara så mycket av proteininnehållet som möjligt. Enligt Tamminga et al. (1991) förhindras växtproteasernas aktivitet till stor del av bra väderförhållanden under torkning. Även i början av ensileringsprocessen är det växtproteaserna som står för huvuddelen av den proteolytiska aktiviteten (Givens & Rulquin, 2004). Enligt McDonald (1982) minskar aktiviteten i takt med att pH faller. Därmed torde en snabb pH-sänkning vara viktig för att bevara så mycket som möjligt av proteininnehållet. Hur länge aktiviteten hos växtenzymerna fortskrider finns det dock olika uppgifter på (Ohshima & McDonald, 1978; Gou et al., 2007). Resultatet i studien av Rinne et al. (1997) är intressant. Vid ensileringsprocessen minskade NDF-innehållet, och det NDF-bundna kvävet stod för den största minskningen. Det NDF-bundna kvävet utgörs av extensinerna, dvs. fraktion B3 (Van Soest, 1994). Eftersom denna fraktion bryts ner långsamt i vommen leder det till att den till stor del går ofermenterad förbi (Van Soest, 1994). Med tanke på detta borde den vara en viktig proteinkälla för idisslaren.

En lösning på problemet med den höga andelen snabbt vomnedbrytbart råprotein, skulle kanske kunna vara att förtorka ensilaget till en högre ts-halt? Om ensilaget är torrare leder det till att fermentationen av kvävekomponenter minskar (Tamminga et al., 1991). Fermentationen vid ensilering ger även upphov till mindre tillgänglig energi för mikroberna i vommen (Givens & Rulquin, 2004). Om ett torrare ensilage leder till en högre mikrobproduktion är dock inte källorna eniga om (Narasimhalu et al., 1989; Jaakkola & Huhtanen, 1993; Verbic et al., 1999).

Mikrobproteinets sammansättning av aminosyror är relativt konstant, men skillnader i aminosyrasammansättningen hos foderprotein som passerar onedbrutet genom vommen påverkar sammansättningen av aminosyror som slutligen når tunntarmen (Arambel & Coon, 1981). Rätt koncentration av olika aminosyror är nödvändig för att uppnå maximal avkastning. Om andelen foderprotein som når tunntarmen ökar så bör man tänka på att aminosyrasammansättningen i fodret spelar en större roll än innan, och därmed bör man försöka få till en sammansättning som kompletterar mikrobernas aminosyrasammansättning.

## **Slutsats**

Växtförädlingen i framtiden borde inriktas på att öka andelen protein som bryts ner långsamt i vommen utan att protein- eller energiinnehållet för den skall minskar. Även en bra sammansättning av aminosyror är viktig. Vid odling och skörd av vallfoder bör man tänka på att inte använda kvävegödsling för intensivt, och passa in skörden när det är lämpligt torkväder. Vid lagring av vallfodret i form av ensilage är det viktigt att uppnå en snabb pH-sänkning. För att kunna göra en bra bedömning av hur vallfodret kommer utnyttjas av djuret räcker det inte med traditionella foderanalyser. Om man vill optimera avkastningen med så liten kväveförlust som möjligt måste man veta hur stor andel av totalkvävet som kommer att utnyttjas av vommens mikrober och hur stor andel av foderprotein som passerar onedbrutet genom vommen (Lanzas, et al., 2008). Kvävetillförseln till mikroberna måste dessutom balanseras med lagom energitillförsel för att undvika ett kväveläckage (Hedqvist, 2004).

## Referenser

- Arambel, M.J., Coon, C.N. 1981. Effects of Dietary Protein on Amino Acids and Microbial Protein of Duodenal Digesta. *Journal of Dairy Science* 64, 2201-2208.
- Balde, A.T., Vandelsall, J.H., Erdman, R.A., Reves, III J.B., Glenn, B.P. 1993. Effect of stage of maturity of alfalfa and orchardgrass on in situ dry matter and crude protein degradability and amino acid composition. *Animal Feed Science and Technology* 44, 29-43.
- Blagoveshensky, G. V., Maryna, M. A., Sokolkov, V. M. 1979. Efficiency of methods of grass treatment before drying. In: *Proceedings of the Second International Green Crop Drying Congress* (eds. Howarth, R.E.), 170-176.
- Bosch, M.W., Van Bruchem, J., Bongers, L.J.G.M., Tamminga, S. 1994. Influence of stage of maturity of grass silages on protein digestion and microbial protein synthesis in the rumen. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 42-3, 203-215.
- Fischer, W-N., André, B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegerder, M., Breitkreuz, K., Frommer, W.B. 1998. Amino acid transport in plants. *Trends in plants science reviews* 3, 188-195.
- Fox, D.G., Tylutki, T.P., Tedeschi, L.O., Van Amburgh, M.E., Chase, L.E., Pell, A.N., Overton, T.R., Russell, J.B. 2003. The net carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Animal Science Mimeo* 213, 14853-4801. Cornell University, New York.
- Givens, D.I., Rulquin, H. 2004. Utilisation by ruminants of nitrogen compounds in silage-based diets. *Animal Feed Science and Technology* 114, 1-18.
- Goswami, A.K., Willcox, J.S. 1969. Effect of applying increasing levels of nitrogen to ryegrass. I. Composition of various nitrogenous fractions and free amino acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 20, 592-595.
- Guo, X., Zhou, H., Yu, Z., Zhang, Y. 2007. Changes in the distribution of nitrogen and plant enzymatic activity during ensilage of lucerne treated with different additives. *Grass and Forage Science* 62, 35-43.
- Hedqvist, H. 2004. *Metabolism of Soluble Proteins by Rumen Microorganisms and the Influence of Condensed Tannins on Nitrogen Solubility and Degradation*. Swedish University of Agricultural Science, Department of Animal Nutrition and Management. Doctoral thesis.
- Hedqvist, H., Udén, P. 2006. Measurement of soluble protein degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 126, 1-21.
- Jaakkola, S., Huhtanen, P. 1993. The effects of forage preservation method and proportion of concentrate on nitrogen digestion and rumen fermentation in cattle. *Grass Forage Science* 48, 146-154.
- Kemble, A.R., Macpherson, H.T. 1954. Monoamino Monocarboxylic Acid Content of Preparations of Herbage Protein. *The Biochemical journal* 58, 44-46.
- Krishnamoorthy, U.C., Muscato, T.V., Sniffen, C.J., Van Soest, P.J. 1982. Nitrogen fractions in selected feedstuffs. *Journal of Dairy Science* 65, 217-225.
- Kolousek, J., Coulson, C.B. 1955. Plant proteins, III: Amino acid content of isolated hay proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 6, 380-386.
- Lanzas, C., Broderick, G.A., Fox, D.G. 2008. Improved Feed Protein Fraction Schemes for Formulating Rations with the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. *Journal of Dairy Science* 91, 4881-4891.
- Lyttleton, J.W. 1973. Proteins and nucleic acids. In: *Chemistry and Biochemistry of Herbage Volume 1* (eds. G.W. Butler & R.W. Bailey), 63-103. Academic Press Inc, London.
- Mangan, J.L. 1982. The nitrogen constituents of fresh forages. In: *Forage Protein in Ruminant Animal Production*. Occasional Publication No.6 (eds. D.J. Thomson, D.E. Beever, R.G. Gunn), 25-40. British

Society of Animal Production.

- Mangan, J.L., Harrison F.A. 1991. Immunoreactive Fraction 1 Leaf Protein and Dry Matter Content During Wilting and Ensiling of Ryegrass and Alfalfa. *Journal of Dairy Science* 74, 2186-2199.
- Martinsson, K. 2003. Dairy cows quality demands on pasture plants. *Sveriges utsädesförenings tidskrift* 113, 149-156.
- Macpherson, H.T. 1952. Changes in nitrogen distribution in crop conservation. 2. Protein breakdown during wilting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 3, 365-367.
- McDonald, P. 1973. The Ensilage Process. In: *Chemistry and Biochemistry of Herbage Volym 3* (eds. G.W. Butler & R.W. Bailey), 33-60. Academic Press Inc, New York & London.
- McDonald, P. 1982. The effect of conservation processes on the nitrogenous components of forages. In: *Forage Protein in Ruminant Animal Production. Occasional Publication No.6* (eds. D.J. Thomson, D.E. Beever, R.G. Gunn), 25-40. British Society of Animal Production.
- McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E. 1991. *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe Publications, Marlow.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan C.A. 2002a. Proteins, nucleic acids and other nitrogenous components. In: *Animal nutrition*, 55-72. Pearson Education, Edinburgh Gate, Harlow.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan C.A. 2002b. Grass and forage crops. In: *Animal nutrition*, 495-514. Pearson Education, Edinburgh Gate, Harlow.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan C.A. 2002c. Evaluation of foods: protein. In: *Animal nutrition*, 313-347. Pearson Education, Edinburgh Gate, Harlow.
- Merchen, N.R., Satter, L.D., 1983. Changes in nitrogenous compounds and sites of digestion of alfalfa harvested at different moisture contents. *Journal of Dairy Science* 66, 789-801.
- Morot-Gaudry, J.-F., Job, D., Lea, P.J. 2001. Amino Acid Metabolism. In: *Plant nitrogen* (eds. Lea, P.J., Morot-Gaudry, J.F.), 167-211. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Paris.
- Morot-Gaudry, J.-F., Touraine, B. 2001. Sources of Nitrogen, Nitrogen Cycle, Root Structure and Nitrogen Assimilation. In: *Nitrogen Assimilation by Plants* (eds. J.-F. Morot-Gaudry), 5-14. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.
- Narashimalu, P., Teller, E., Vanbelle, M., Foulon, M., Dasnoy, F., 1989. Apparent digestibility of nitrogen in rumen and whole tract of Friesian cattle fed direct cut and wilted silages. *Journal of Dairy Science* 72, 2055-2061.
- Ohshima, M., McDonald, P. 1978. A review of the Changes in Nitrogenous Compounds of Herbage During Ensilage. *Journal of Science Feed Agriculture* 29, 497-505.
- Oriz-Lopez, A., Chang, H.-C., Bush, D.R. 2000. Amino acid transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 275-280.
- Pilbeam, D.J., Kirkby, E.A. 1992. Some aspects of the utilization of nitrate and ammonium by plants. In: *Nitrogen Metabolism of Plants* (eds. K. Mengel, D.J. Pilbeam), 55-70. Clarendon Press, Oxford.
- Rinne, M., Jaakkola S., Huhtanen, P. 1997. Grass maturity effects on cattle fed silage-based diets. 1. Organic matter digestion, rumen fermentation and nitrogen utilization. *Animal Feed Science Technology* 67, 1-17.
- Robinson, P.H., Chalupa, W., Sniffen, C.J., Julien, W.E., Sato, H., Fujieda, T., Watanabe, K., Suzuki, K. 1999. Influence of post-ruminal supplementation of methionine and lysine, isoleucine, or all three amino acids on intake and chewing behaviour, ruminal fermentation, and milk and component production. *Journal of Animal Science* 77, 2781-2792.
- Schei, I. 2006. Utilization of metabolizable protein in dairy cows - effects at low energy supply. Norwegian University of Life Science. Department of animal and aquacultural sciences. Doctor

scientiarum thesis.

- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G., Russel, J.B. 1992. A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets: II. Carbohydrate and Protein Availability. *Journal of Animal Science* 70, 3562-3577.
- Sullivan, J.T., 1973. Drying and Storing Herbage as Hay. In: *Chemistry and Biochemistry of Herbage Volym 3* (eds. G.W. Butler & R.W. Bailey), 1-31. Academic Press Inc, New York & London.
- Tamminga, S., Ketelaar, R., Van Vuuren, A.M. 1991. Degradation of nitrogen compounds in conserved forages in the rumen of dairy cows. *Grass and Forage Science* 46, 427-435.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press.
- Van Vuuren, A.M., Tamminga, S., Ketelaar R. 1991. *In sacco* degradation of organic matter and Crude protein of fresh grass (*Lolium perenne*) in the rumen of grazing dairy cows. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 116, 429-436.
- Van Vuuren, A.M. 1993. Variations in protein and carbohydrates in fresh grass. In: *Digestion and nitrogen metabolism of grass fed dairy Cows* (eds. A.M. Van Vuuren), 1-13. Research Institute for Livestock Feeding and Nutrition, Lelystad, Nederlanderna.
- Van Vuuren, A.M., Meijs, J.A.C. 1993. Effects of herbage composition and supplement feeding on the excretion of nitrogen in dung and urine by grazing dairy cows. In: *Digestion and nitrogen metabolism of grass fed dairy cows* (eds. A.M. Van Vuuren), 15-23. Research Institute for Livestock Feeding and Nutrition, Lelystad, Nederlanderna.
- Van Vuuren, A.M., Van der Koelen, C.J., Valk, H., De Visser, H. 1993. Effects of Partial Replacement of Ryegrass by Low Protein Feeds on Rumen Fermentation and Nitrogen Loss by Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 76, 2982-2993.
- Verbic, J., Ørskov, E.R., Žgajnar, J., Chen, X.B., Žnidaršič-Pongrac Vida. 1999. The effect of method of forage preservation on the protein degradability and microbial protein synthesis in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 82, 195-212.
- Volden, H. 1999. Protein metabolism in the gastro-intestinal tract of lactating dairy cows. Agricultural University of Norway, Department of Animal Science. Thesis for the Degree of Doctor Agriculturae.
- Wallace, R.J., Onodera, R., Cotta, M.A. 1997. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: *The rumen Microbial Ecosystem*. (eds. P.N. Hobson, C.S. Stewart), 283-328. Chapman & Hall, London.
- Wilson, R.F., Tilley, J.M.A. 1965. Amino-acid composition of lucerne and of lucerne and grass protein preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 16, 173-178.
- Ulyatt, M.J. 1981. The feeding value of temperate pastures. In: *Grazing Animals* (eds. F.H.W. Morley), 125-141. Elsevier Scientific Publishing Co, Amsterdam.



