



Metoder för reduktion av halten lättlösliga kolhydrater i vallfoder och jämförelse av analysmetoder

Methods for the reduction of soluble carbohydrate levels in conserved roughages and the comparison of analytical methods

av

Emma Pettersson

**Institutionen för husdjurens utfodring och vård
Sveriges lantbruksuniversitet**

***Department of Animal Nutrition and Management
Swedish University of Agricultural Sciences***

**Examensarbete 358
30 hp A2E-nivå**

***Degree project 358
30 credit A2E-level
Uppsala 2011***



Metoder för reduktion av halten lättlösliga kolhydrater i vallfoder och jämförelse av analysmetoder

Methods for the reduction of soluble carbohydrate levels in conserved roughages and the comparison of analytical methods

av

Emma Pettersson

Handledare/ *Supervisor*: Cecilia Müller

Examinator/ *Examiner*: Peter Udén

Nyckelord/ *Key words*: Ensilage, hösilage, hö, WSC, lättlösliga kolhydrater, lagringstid, ensileringsmedel, blötläggning, analysmetoder

**Institutionen för husdjurens utfodring och vård
Sveriges lantbruksuniversitet**

**Examensarbete 358
30 hp A2E-nivå
Kurskod EX0552**

***Department of Animal Nutrition and Management
Swedish University of Agricultural Sciences***

***Degree project 358
30 credit A2E-level
Course code EX0552
Uppsala 2011***

Nr	Titel och författare	År
350	Effekt av spensugande kvigor samt dess effekt på mjölkkörteln Effect of intersucking and its impact on the mammary gland 15 hp C-nivå Caroline Eriksson	2011
351	Jämförelse mellan renskötsel och betesbaserad fårskötsel Comparison of reindeer husbandry and pasture based sheep husbandry 15 hp C-nivå Julia Bäckström	2011
352	Betets avkastning på olika typer av naturbetesmark – en fält- och metodstudie Pasture yield on different types of semi-natural pastures – a field and methodology study 30 hp E-nivå Josefin Back	2011
353	I vilken utsträckning kan hästar enbart utfodras med grovfoder? In what extent can horses only be fed with roughhage? 15 hp C-nivå Emelie Ferm	2011
354	Krafftodrets påverkan på återhämtningsförmågan hos hästar efter träning och transporter The impact of concentrate on the recovery in horses after training and transportation 30 hp E-nivå Madeleine Axelsson	2011
355	Swedish-produced protein feed for pigs Svenskproducerat proteinfoder till slaktsvin 15 hp C-nivå Hanna Nilsson	2011
356	Quantification of sleep in dairy cows in three different stages of lactation 30 hp E-nivå Emma Nilsson	2011
357	Milk production in dairy cows and goats – a case study in the Nyando district in South-Western Kenya 15 hp G2E-nivå Lina Wallberg	2011

I denna serie publiceras examensarbeten (motsvarande 15, 30, 45 eller 60 högskolepoäng) vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Sveriges lantbruksuniversitet. En förteckning över senast utgivna arbeten i denna serie återfinns sist i häftet. Dessa, samt tidigare arbeten, kan i mån av tillgång erhållas från institutionen.

In this series Degree projects (corresponding 15, 30, 45 or 60 credits) at the Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, are published. Earlier numbers are listed at the end of this report and may be obtained from the department as long as supplies last.

DISTRIBUTION:
Sveriges Lantbruksuniversitet
Institutionen för husdjurens utfodring och vård
Box 7024
750 07 UPPSALA
Tel. 018-67 28 17

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

REFERAT	1
INLEDNING	2
LITTERATURSTUDIE	3
LÄTTLÖSLIGA KOLHYDRATER I VALLFODER	3
Definition av lättlösliga kolhydrater	3
Faktorer som påverkar innehållet av lättlösliga kolhydrater	3
<i>Växtens art och sort</i>	3
<i>Fotosyntes och respiration</i>	4
<i>Näringstillgång och kvävegödning</i>	5
<i>Växtens utvecklingsstadium och avbladning</i>	5
<i>Stubbhöjd</i>	5
<i>Förtorkning</i>	6
<i>Konservering och lagring</i>	6
<i>Mjölksyrabakterier som ensileringsmedel</i>	7
<i>Blötläggning av hö</i>	8
BESTÄMNING AV LÄTTLÖSLIGA KOLHYDRATER I VALLFODER	10
Enzymatisk-spektrofotometrisk metod	10
Fourier transformerad infraröd spektroskopi	11
HÄSTENS DIGESTION AV LÄTTLÖSLIGA KOLHYDRATER	12
SJUKDOMAR RELATERADE TILL ÖVERUTFODRING AV LÄTTLÖSLIGA KOLHYDRATER HOS HÄST	12
Insulinresistens	13
Fång	13
Equine metabolic syndrome	14
Equine Cushing's syndrome	14
EGEN STUDIE	15
SYFTE	15
MATERIAL OCH METODER	15
Skörd och inläggning av grönmassa	15
Provtagning och blötläggning av foder	16
Preparering av prover	17
Analyser	17
<i>Enzymatisk- spektrofotometrisk analys</i>	17
<i>Fourier transformerad infraröd analys</i>	18
Beräkningar	18
Statistisk analys	18

RESULTAT OCH DISKUSSION	19
Effekt av lagringstid	19
Effekt av konserveringsmetod	23
Effekt av ensileringsmedel	25
Effekt av blötläggning	27
Jämförelse av analysmetoder för lösliga kolhydrater	33
Potentiella metoder för reduktion av lösliga kolhydrater i vallfoder	35
SLUTSATSER	36
Möjligheter att påverka innehållet av lösliga kolhydrater	36
Jämförelse av analysmetoder för lösliga kolhydrater	36
ACKNOWLEDGEMENTS	37
ABSTRACT	38
LITTERATURFÖRTECKNING	39

REFERAT

Syftet med detta examensarbete var att hitta praktiska metoder för att reducera innehållet av glukos, fruktos, sukros och fruktaner, så kallade lättlösliga kolhydrater (WSC), i vallfoder. Ett vallfoder med mindre mängd WSC kan vara användbart för hästar som har fång, är insulinresistenta eller har fått diagnosen EMS (equine metabolic syndrome) eller Equine Cushing's syndrome. Faktorer som kan påverka innehållet av WSC i vallfoder är bl.a. växtens utvecklingsstadium, konserveringsmetod, lagringstid, tillsats av mjölksyrabakterier till ensilage/hösilage, samt blötläggning av foder innan utfodring.

Ytterligare ett syfte med studien var att utvärdera Fourier transformerad infraröd analys (FTIR) av WSC-innehållet i vallfoder och jämföra denna metod med den enzymatisk-spektrofotometriska analysmetod som används i dagsläget. FTIR-analys används vanligen till mjölkanalyser men skulle kunna vara ett alternativ till enzymatisk-spektrofotometrisk analys då den är snabbare och billigare.

Syftet med den egna studien var att undersöka hur konserveringsmetod, lagringstid, blötläggning och tillsats av ensileringsmedel innehållande mjölksyrabakterier påverkade WSC-innehållet i olika vallfoder. Till det praktiska försöket skördades vallgröda i mitten av juni 2010. Grödan konserverades som ensilage (40 % ts-halt) och hösilage (60 % ts-halt) i 25-literssilor med och utan osmotoleranta mjölksyrabakterier, och som hö (85 % ts-halt) pressat till småbalar och torkade på planbottentork. Silorna och höbalarna öppnades efter 3 månaders lagring och prover från denna öppning analyserades med avseende på kemisk och mikrobiologisk sammansättning samt WSC-fraktioner. Vid detta tillfälle blötlades ensilage, hösilage och hö i kranvatten i 12 respektive 24 timmar, då prover togs ut för analys av WSC-innehåll (12 och 24 h) och mikrobiologisk sammansättning (endast efter 24 timmar). När silorna och höbalarna varit lagrade i totalt 6 månader provtogs dessa och analyserades med avseende på halten av WSC.

Hö och ensilage hade det lägsta innehållet av WSC (efter 3 månaders lagring), jämfört med hösilage som innehöll högst WSC-halt. Lagringstiden hade ingen effekt på WSC-innehållet i ensilage och hösilage, medan hö lagrat i 6 månader hade lägre sockerinhåll än efter 3 månaders lagring. Fruktos- och totala WSC-halten i ensilage och hösilage var lägre för foder som hade konserverats med tillsatta mjölksyrabakterier, jämfört med foder utan tillsats av ensileringsmedel. Blötläggning hade ingen effekt på WSC-halten i hö, men gav störst reduktion av WSC-innehållet i ensilage efter 24 timmars blötläggning.

Det fanns en skillnad i analyserade WSC-värden mellan FTIR-analys och enzymatisk-spektrofotometrisk analys när alla fodertyper inkluderades. FTIR-analysen gav högre värden för WSC-halt än enzymatisk- spektrofotometrisk analysen vid dessa jämförelser. Däremot gav metoderna lika resultat för analyserade värden när alla fodertyper lagrade i 3 respektive 6 månader jämfördes.

INLEDNING

Den faktor som har störst påverkan på näringsinnehållet i vallfoder är vallens botaniska utvecklingsstadium vid skörd. Kolhydratsammansättningen i vallfoder ändras under vallens tillväxt, men styrs också av andra faktorer som har mindre inverkan än plantmognaden. Socker i gräs, dvs. glukos, fruktos, sukros och fruktaner, sammantaget kallat för lättlösliga kolhydrater (WSC, water soluble carbohydrates) (McDonald *et al.*, 2002), kan vara av intresse för en del utfodringsrelaterade sjukdomar hos häst. Exempel på sådana sjukdomar är fång (Frape, 2010), insulinresistens (IR) (Hoffman, 2003) och equine metabolic syndrome (EMS) (Frank, 2009). Dessa sjukdomar kan vara en följd av att hästen är överviktig. Övervikten är i sig orsakad av överutfodring (av bl a WSC) men oftast över en längre tid (Frape, 2010). För att kunna utfodra dessa typer av hästar utan att förvärra deras hälsoläge behöver intaget av WSC kontrolleras.

Hästar som har fått diagnosen EMS eller IR behöver minska sitt intag av socker och stärkelse för att förbättra insulinkänsligheten. Om hästen inte utfodras med kraftfoder är det alltså WSC-innehållet i vallfodret som behöver minskas (Frank, 2009). Att blötlägga höet är en rekommendation som ofta ges från veterinärer till hästägare med insulinresistenta hästar eller hästar med fång. Blötläggning sägs reducera halten av lättlösliga kolhydrater i höet, men effektiviteten i denna procedur är dock tveksam. Det är också oklart om blötläggningen påverkar fodrets hygieniska kvalitet och övriga näringsinnehåll. Dessutom krävs relativt stora mängder vatten vid blötläggning vilket kan utgöra en miljörisk (Longland *et al.*, 2009). Det finns få studier gjorda som undersökt om WSC-innehållet i hö minskar med blötläggning, och inga studier om blötläggningens effekt på andra typer av vallfoder, som t ex hösilage eller ensilage, finns.

Det finns därmed ett behov av att få fram pålitliga metoder att reducera WSC i vallfoder. Ensilage och hösilage är vanliga grovfoder till hästar och det är därför intressant att se även hur dessa fodertyper påverkas av blötläggning utöver hö. Eftersom ensilage, hösilage och hö kan lagras under en längre period är det också av intresse att undersöka om lagringstiden påverkar WSC-halten i dessa fodertyper. Dessutom gör ensileringsprocessen i ensilage och till viss del i hösilage att WSC-innehållet minskar, då mjölksyrabakterier förbrukar WSC och bildar mjölksyra, vilket sänker pH-värdet i fodret. Mjölksyrabakterier finns naturligt på vallgrödan och dessa utnyttjas vid naturlig fermentation av gräs men det går även att tillsätta mjölksyrabakterier som ensileringsmedel (McDonald *et al.*, 2002).

Eftersom analys av WSC-innehållet i vallfoder inte är en rutinmässig analys av vallfoder innebär en sådan extra kostnad för hästägaren. I dagsläget används en enzymatisk-spektrofotometrisk metod som är relativt dyr. Det finns därför ett behov av billigare och mer tillgängliga analysmetoder för att analysera WSC-halten i vallfoder.

Syftet med detta examensarbete var att undersöka vilka praktiska metoder som kan reducera WSC-halten i vallfoder. Till det praktiska försöket användes ensilage, hösilage och hö från samma vall. De faktorer som undersöktes var effekten av konserveringsmetod, lagringstid, blötläggning och tillsats av ensileringsmedel innehållande mjölksyrabakterier. WSC-innehållet i foderproverna analyserades med enzymatisk-spektrofotometrisk analys och FTIR-spektroskopi, för att även utvärdera om det fanns någon skillnad mellan analysmetoderna.

LITTERATURSTUDIE

LÄTTLÖSLIGA KOLHYDRATER I VALLFODER

Definition av lättlösliga kolhydrater

Lättlösliga kolhydrater kallas vanligen för socker, och består av glukos, fruktos (monosackarider), sukros (disackarid), raffinös och stachyos (oligosackarider), samt fruktaner som dock tillhör icke-socker eftersom det är polysackarider (Butler & Bailey, 1973; McDonald *et al.*, 1991; McDonald *et al.*, 2002). Alla socker är vattenlösliga (Butler & Bailey, 1973). Socker och kortkedjiga fruktaner är enligt Watts (2003) lösliga i kallt vatten, medan de långkedjiga fruktanerna är lösliga i varmt vatten. Enligt McDonald *et al.* (2002) är fruktaner lösliga i kallt vatten.

Kolhydrater i vallfoder delas oftast in i strukturella och icke-strukturella kolhydrater (Non-Structural Carbohydrates, NSC). Strukturella kolhydrater är fibrer som cellulosa och hemicellulosa. De icke-strukturella kolhydraterna inkluderar både WSC och stärkelse (McDonald *et al.*, 1991). Icke-strukturella kolhydrater är lättillgänglig energi som växten behöver för sin tillväxt och överlevnad (Butler & Bailey, 1973).

I växter lagras glukos vanligen som stärkelse eller fruktaner. Begreppet fruktaner används ofta för att beskriva kolhydrater som innehåller flera fruktosenheter (NRC, 2007). Fruktoligosackarider, inulin och levan är exempel på fruktaner. Inulin finns i korgblommiga växter (*Compositae*) och är sammanlänkade genom β -2,1-bindningar. Levan finns i tempererade gräs, och är sammansatta via β -2,6-bindningar (Butler & Bailey, 1973; McDonald *et al.*, 1991). Fruktaner fungerar som växtens energireserv och finns huvudsakligen i gräsets stam. Av det totala WSC-innehållet i gräs förekommer fruktaner i störst koncentration (McDonald *et al.*, 2002).

Faktorer som påverkar innehållet av lättlösliga kolhydrater

Växtens art och sort

WSC-innehållet i gräs varierar bl.a. beroende på gräsart från så lite som 25 g/kg ts i tropiska gräs till 300 g/kg ts i vissa rajgräs (McDonald *et al.*, 2002). I tempererade klimat finns C3-gräs som lagrar in fruktaner; levan eller inulin, som en energireserv. I tropiska klimat finns det C4-gräs som använder stärkelse som energireserv (McDonald *et al.*, 2002). Skillnaden mellan tempererade och tropiska gräs är alltså vilken typ av lagringskolhydrat de använder; fruktaner respektive stärkelse (McDonald *et al.*, 1991).

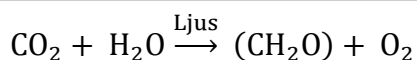
Det finns mindre andel WSC i baljväxter jämfört med gräs. I klöver är sukros det socker som förekommer i högst halt. Det finns inga fruktaner i klöver, men däremot stärkelse (McDonald *et al.*, 2002).

Det finns också skillnader i WSC-innehåll mellan olika arter av gräs. Skott från plattlosta (*Bromus willdenowii*) innehöll mer WSC i jämförelse med skott från hundäxing (*Dactylis glomerata*) vid samma stubbhöjd (Turner *et al.* 2007). Engelskt rajgräs (*Lolium perenne*) är det gräs som innehåller högst halt av lättlösliga kolhydrater (McDonald *et al.*, 2002).

Sortförädling inom samma gräsart innebär också att sorter kan ha olika innehåll av WSC (McDonald *et al.*, 1991). Grässorter med höga halter av icke-strukturella kolhydrater har förädlats fram för att tillgodose näringsbehovet för mjölk- och köttproducerande djur. Dessa grässorter antas ha en högre smaklighet pga. den högre sockerhalten. Det högre innehållet av icke-strukturella kolhydrater bidrar också till att gräset blir mer produktivt och motståndskraftigt mot vinter och torka (Watts, 2003).

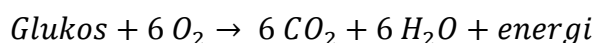
Fotosyntes och respiration

Gräsets innehåll av WSC är beroende av hur mycket fotosyntes och respiration som sker i växten. Generellt sker fotosyntes och respiration samtidigt (McDonald *et al.*, 1991). Vid fotosyntes omvandlas koldioxid och vatten till kolhydrater genom energin från solljus (figur 1). Fotosyntes i gröna växter sker i kloroplaster där energin från solljuset fångas av pigmentmolekyler, klorofyll, vilket genererar elektroner. Elektronerna används för att producera nikotinamid adenin dinukleotidfosfat (NADPH) och adenosintrifosfat (ATP) i citronsyracykeln, där kol oxideras till koldioxid. NADPH och ATP omvandlar koldioxid till 3-fosfoglycerat genom en rad reaktioner som kallas Calvincykeln eller mörkerreaktion. I stroma i kloroplasten finns enzymer som använder NADPH och ATP för att omvandla koldioxid till socker (Berg *et al.*, 2002). Fotosyntesens hastighet regleras av ljusintensitet och temperatur. Tillgången på vatten är viktig för att fotosyntesen skall kunna ske och så länge det finns tillräckligt med vatten kan fotosyntes ske t.o.m. vid frysgrader. Vid molnigt väder (låg ljusintensitet) minskar fotosyntesen vilket innebär att det bildas mindre mängd lättlösliga kolhydrater (McDonald *et al.*, 1991). När produktionen av glukos och fruktos överstiger plantans behov av energi blir det lagrat som stärkelse eller fruktaner i växtstjälken, beroende på vilken växt det är (Butler & Bailey, 1973).



Figur 1. Ekvationen beskriver fotosyntes efter Berg *et al.* (2002).

Vid respiration sker en oxidativ nedbrytning av organiska föreningar vilket genererar energi enligt figur 2 (Berg *et al.*, 2002). Respirationen sker oftast under natten (låg ljusintensitet) och då används främst de kolhydrater som producerats under fotosyntesen som energi för bildande av proteiner och strukturella kolhydrater (cellulosa, hemicellulosa) som finns i gräsets cellväggar (Mackenzie & Wylam, 1957). Vid kyla minskar dock respirationen vilket ökar WSC-halten i gräset. Vid varmt och molnigt väder används glukos för tillväxt och det bildas koldioxid och vatten (McDonald *et al.*, 1991).



Figur 2. Ekvationen beskriver respiration efter Berg *et al.* (2002).

Respiration sker även i grödan efter slåtter så länge det finns både syre och substrat tillgängligt. Därför är det viktigt att snabbt få anaeroba förhållanden i silon (eller balen) om man vill minska förlusterna av lättlösliga kolhydrater. En syrefri miljö är även viktigt för att få ett hygieniskt bra ensilage då respirationen orsakar värmebildning som gynnar tillväxt av oönskade mikroorganismer (McDonald *et al.*, 1991; McDonald *et al.*, 2002).

Ett ensilage med ett högt innehåll av WSC kan få problem med den aeroba stabiliteten när ensilaget blir exponerat för luft (när silon eller balen har öppnats). Detta kan bidra till att oönskade mikroorganismer gynnas på bekostnad av att det näringsmässiga innehållet minskar (Conaghan *et al.*, 2010).

Näringsstillgång & kvävegödning

Kvävegödning minskar halten lättlösliga kolhydrater i gräs (Butler & Bailey, 1973; McDonald *et al.*, 1991; McDonald *et al.*, 2002). Minskningen beror troligen på att gräsets tillväxt ökar p.g.a. kvävegödningen då energi i form av kolhydrater används, vilket resulterar i en minskning av främst halten fruktaner (Butler & Bailey, 1973).

Växtens utvecklingsstadium och avbladning

Ett gräs i reproduktivt stadium har generellt ett högt fiberinnehåll medan innehållet av NSC är lågt. Dock påverkas innehållet av NSC mycket av miljömässiga faktorer. Frost eller hetta påverkar kolhydratsammansättningen på kort sikt (Watts & Chatterton, 2004).

Halten lättlösliga kolhydrater i gräs påverkas av avbladning (vid skörd eller avbetning), där stubbhöjd och intervaller mellan skörd eller avbetningar är påverkande faktorer (Turner *et al.* 2007). Detta beror på att gräsets utvecklingsstadium är en viktig faktor som påverkar innehållet av WSC. Efter att gräset är avslaget eller avbetat återväxer det i försök att uppnå mognad då axet innehåller reproduktiva fröer, beroende på vilken typ av gräs det är. Bladgräs återväxer med större andel vegetativa skott, medan strågräs återväxer med axbärande strå (McDonald *et al.*, 2002). Innehållet av WSC är högre strax före axgång, då gräset har mer cellinnehåll än cellväggar. Cellväggar innehåller cellulosa, hemicellulosa och lignin, medan WSC finns i cellinnehållet (McDonald *et al.*, 2002).

Halterna av glukos, fruktos och sukros har i en studie visats minska med plantans mognad i rörsvingel (*Festuca arundinacea*), medan fruktanhalten ökade. Detta beror på att andelen stjälk blir mer dominerande med ökat utvecklingsstadium hos gräs (Shewmaker *et al.*, 2006). Enligt Frappe (2010) är fruktaninnehållet i bete högst på våren, lägst i mitten på sommaren och medel på hösten.

Stubbhöjd

Halten WSC minskade med ökad stubbhöjd för vegetativa skott av plattlosta (*Bromus willdenowii*) och hundäxing (*Dactylis glomerata*) i växthusförsök (Turner *et al.*, 2007). Turner *et al.* (2007) rekommenderade en stubbhöjd på 45-50 mm för att bibehålla tillräckligt med WSC för återväxt av dessa två gräsarter. Även en stubbhöjd på 30 mm är godtagbar för hundäxing, men inte för plattlosta, eftersom denna art är mer känslig för avbladning (Turner *et al.*, 2007).

Generellt rekommenderas en stubbhöjd på ca 8-10 cm för att minska risken för inblandning av jord eller gödsel. En hög stubb lyfter dessutom strängen så att den torkar bättre (Neuman, 2002).

Förtorkning

Innehållet av WSC i gräs påverkas mycket av respiration och fotosyntes, men även efter att gräset är skördat fortsätter plantans innehåll att förändras (Wylam, 1953). Vid förtorkning sker förluster av näringsämnen pga. olika processer: växtenzymers och mikroorganismers aktivitet, oxidation, urlakning och skördeteknik. Under förtorkning blir fruktaner hydrolyserade till fruktos av växtenzym (McDonald *et al.*, 2002) och hydrolys sker snabbast om gräset torkas under fuktiga förhållanden (Wylam, 1953). Vid fuktiga väderförhållanden gynnas mikroorganismer att växa i slaget gräs som har legat några dagar. Urlakning av lösliga mineraler, socker och kväveinnehållande ämnen sker när det kommer regn på en delvis torkad vall. När vallgrödan hanteras efter förtorkning är växten skör och bladen lossnar lätt, detta påverkar proteininnehållet i det bärgade vallfodret eftersom bladen innehåller mer protein. En snabb förtorkning till den önskade ts-halten minskar förlusterna av WSC (Wylam, 1953; McDonald *et al.*, 2002), vilket innebär att en fördröjd och långsam förtorkning kan minska WSC- innehållet i den slagna vallen, men också att den hygieniska kvaliteten kan äventyras.

Vilken typ av slåttermaskin som används till vallskörden kan också påverka hur snabbt förtorkningen går. Det beror på att olika typer av slåttermaskiner bearbetar gräset olika och detta påverkar hur snabb förtorkningen blir. Exempelvis trumslåttaren har roterande tallrikar som skär av gräset, medan slåtterkrossar slår sönder grässtrået. Förtorkningen går långsammare och mikroorganismer hinner respirera och förbruka mer socker då trumslåttermaskin använts. När slåtterkross använts snabbas förtorkningen på eftersom vatten avdunstar lättare från ett krossat strå, vilket också innebär att mer WSC blir bevarat jämfört med när trumslåtter använts. En snabbare förtorkning bevarar mer socker vilket är en fördel i ensileringsprocessen. Respirationen av WSC upphör vid ca 70 % ts-halt, men eftersom grönmassa som torkas på slag oftast är torrare på ytan och blötare närmast marken kan det variera inom strängen hur mycket respirationen fortgår (Neuman, 2002).

Konservering och lagring

Innehållet av lättlösliga kolhydrater i konserverat vallfoder varierar beroende på vilken typ av konserveringsmetod man använt för att lagra fodret under vintern. Skillnaderna beror på respiration, hydrolys och fermentation av lättlösliga kolhydrater under förtorkning, ensilering och torkning. Det totala innehållet av WSC är lägre i ensilage än i hö pga. mjölksyrabakteriernas fermentativa aktivitet där WSC omvandlas till mjölksyra (McDonald *et al.*, 2002).

Ensilage kan vara både obehandlat och behandlat med ensileringsmedel (McDonald *et al.*, 2002). I ensileringsprocessen hos ett obehandlat gräs sker en naturlig fermentation, som utförs av mjölksyrabakterier som finns naturligt på grödan, epifytiska mjölksyrabakterier, i en anaerob miljö. Mjölksyrabakterierna använder substrat, oftast i form av WSC, och bildar mjölksyra vilket gör att pH sänks (McDonald *et al.*, 1991). Mjölksyrabakterierna är fakultativt anaeroba och de fermenterar huvudsakligen glukos och fruktos. Vid lågt pH hämmas oönskade mikroorganismer som t.ex. klostridier och enterobakterier, som annars kan producera smörsyra och ammoniak vilket försämrar ensilagens näringsvärde och hygieniska kvalitet (McDonald *et al.*, 2002). pH-sänkningen i ensilaget är viktigt för att lyckas med ensileringen och ju snabbare pH-värdet sänks desto bättre. Ett hackat ensilage fermenteras snabbare då substratet i cellinnehållet blir mer tillgängligt för mjölksyrabakterier (McDonald *et al.*, 1991).

Lättlösliga kolhydrater behövs alltså för att få en lyckad ensilering. Ett lågt innehåll av WSC i grönmassan vid skörd kan ge problem med klostridiesporer i ett ensilage med låg ts-halt. Man kan lösa detta problem genom att förtorka grönmassan före ensilering till en högre ts-halt, då klostridiebakterier kräver en miljö med hög vattenaktivitet för att kunna vara aktiva. Det sker dock förluster av WSC under förtorkningen pga. den respiration som sker (McDonald *et al.*, 1991).

Hösilage har högre ts-halt än ensilage och därför är fermentationen begränsad eftersom mjölksyrabakterier behöver vatten för att kunna vara aktiva. Detta resulterar i en lägre eller ingen pH-sänkning, för att mindre mjölksyra produceras, och högre andel lättlösliga kolhydrater finns kvar i hösilage jämfört med ensilage (McDonald *et al.*, 2002).

Lagringstiden för hö har påvisats påverka näringsinnehållet. En ökning av fiberhalten och en minskning av innehållet av kvävefria extraktivämnena (NFE), socker och karoten har påvisats efter lagring i 192 dagar. Det totala sockerinnehållet minskade med 19 %. Den största förändringen av sockerinnehållet skedde under den första veckan av konservering, och därefter planade minskningen ut och var stabil efter en månads konservering och lagring (Archibald *et al.*, 1951). Denna minskning beror troligen på respiration (McDonald *et al.*, 2002).

Mjölksyrabakterier som ensileringsmedel

Mjölksyrabakterierna använder WSC, främst fruktos och glukos, som substrat och producerar organiska syror, huvudsakligen mjölksyra beroende på om mjölksyrabakterierna är homofermentativa eller heterofermentativa. Syrorna gör att pH sänks vilket gör ensilaget mer lagringsdugligt. En önskvärd mängd mjölksyrabildande bakterier i gräs som ska ensileras är $>10^4/g$. Om ensileringsmedel med mjölksyrabakterier används rekommenderas en större koncentration mjölksyrabildande bakterier, minst $10^5/g$ för att få en bra ensilering (Spörndly, 2003). I ett sent skördat ensilage som har ett lägre innehåll av glukos och fruktos är mjölksyrabakteriernas förmåga att bryta ned fruktaner till fruktosmolekyler viktig då fruktos kan användas som energikälla för mikroorganismerna. Det finns olika mjölksyrabakteriestammar som bryter ned fruktaner olika snabbt och mycket. Exempelvis *Lactobacillus paracasei* har påvisats kunna fermentera fruktaner i ensilage. *Lactobacillus plantarum* kan också bryta ned fruktaner men inte lika snabbt och effektivt som *L. paracasei*. Inokulering med mjölksyrabakterier som kan bryta ned fruktaner kan förbättra fermentationen i ensilage, speciellt i sent skördat vallfoder som innehåller högre fruktanhalter och lägre halter enkla socker (Merry *et al.*, 1995). Detta skulle kunna vara användbart när man vill reducera fruktanhalten i ensilaget. Om all fruktos sedan åtgår vid ensileringen skulle det i sin tur bidra med att sänka det totala innehållet av WSC i ensilaget.

I en jämförelse av återstoden av WSC-halten i rajgräensilage som behandlats med olika tillsatsmedel gav homofermentativa mjölksyrabakterier ett bra fermenterat ensilage vid 25 % ts respektive 36,5 % ts men ett dåligt fermenterat ensilage vid lägre ts-halt (14,5 % ts). De olika tillsatsmedel som jämfördes var ammoniumtetraformat; homofermentativa mjölksyrabakterier; en mix av *Lactobacillus buchneri* och homofermentativa mjölksyrabakterier samt en mix av natriumbenzoat, natriumpropionat, natriumnitrit och hexametylentetramin. *L. buchneri* i kombination med homofermentativa mjölksyrabakterier (LAB) var den minst lyckade behandlingen i försöket att bibehålla mer WSC efter ensilering (Conaghan *et al.*, 2010). En behandling med *L. buchneri* och homofermentativa LAB skulle därmed kunna vara en metod för att minska WSC-innehållet i ensilage. Grönmassa som

inokulerats med *L. buchneri* och homofermentativa LAB (*Pediococcus pentosaceus* och *L. plantarum*) tillsammans har dock i andra ensileringsförsök resulterat i något högre koncentrationer av WSC efter fermentation jämfört med obehandlat ensilage. Ensilage behandlat med enbart *L. buchneri* hade lägst innehåll av WSC och det hösta innehållet av WSC fanns i ensilage behandlat med *P. pentosaceus* och *L. plantarum* ($P < 0,001$) (tabell 1) (Driehuis *et al.*, 2001).

Tabell 1. Effekten av mjölksyrabakterier som ensileringsmedel på halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) och mjölksyra (g/kg ts) i ensilage lagrat i 90 dagar (Driehuis *et al.*, 2001)

Behandling	Torrsubstans g/kg	Mjölksyra	WSC	P-värde
Ingen behandling	322	62	70	Saknas
LB	376	59	51	Saknas
PL	336	89	149	Saknas
LB + PL	373	78	107	Saknas

LB= *L. buchneri*

PL= *P. pentosaceus* + *L. plantarum*

Blötläggning av hö

Att blötlägga hö är en vanlig rekommendation från veterinärer till hästägare med hästar som har eller är i riskzonen för att utveckla fång, EMS eller insulinresistens. Det finns dock få studier gjorda på huruvida WSC-innehållet i hö påverkas av blötläggning samt under hur lång tid blötläggningsen i sådana fall skall ske för att WSC-halten skall reduceras. Pålitligheten hos de få studier som gjorts på området är också tveksamma, då t ex Watts (2003) och Cottrell *et al.* (2005) försök inte är publicerade i referee-granskade vetenskapliga tidskrifter.

Blötläggningstiden och vattentemperaturens effekt på reduktion av WSC-halten testades för olika typer av hö (Watts, 2003). Hötyperna bestod ren lusern, gräs/lusernblandning, rent gräshö och havrehö. Det var 15 höprover, varje prov delades därefter i fyra mindre prover och testades för fyra olika metoder enligt följande: Ingen blötläggning; 30 minuter i 28°C kranvatten; 60 minuter i 28°C kranvatten; 30 minuter i 50°C kranvatten. Varje prov vägde 50 gram och blötlades i 4 l vatten. Resultaten uppvisade stor variation med avseende på reduktion av halten WSC, men det fanns en tendens till att 30 minuters blötläggning i 50°C gav lägst WSC-halt. Dock var WSC-innehållet högre för vissa prover blötlagda i 30 minuter i 50°C jämfört med 60 minuters blötläggning i 28°C, som i vissa fall hade lägst WSC-innehåll. Förklaringen till de varierande resultaten var bl.a. att det hö som inte minskade mycket i WSC-halt hade stor andel stjälk och högt innehåll av lignin, vilket kunde hindra vatten från att penetrera växtmaterialet. Hö från hundäxing innehöll 7,3 % WSC före blötläggning, 5,1 % efter 30 minuters blötläggning, 4,0 % efter 60 minuters blötläggning och 3,8 % efter 30 minuter i varmt vatten (Watts, 2003).

I ett annat försök blötlades hackat hö (5-7 cm långa strån) från hundäxing i 30 respektive 60 minuter. Vattenvolymer eller provvikter angavs inte men allt hö var täckt av vatten under blötläggningsen. Höet innehöll 12 % WSC före blötläggning. Efter 30 minuters blötläggning var WSC-halten 5,6 % och efter 60 minuter var den 5,7 %. Kaliumhalten, som även analyserades, minskade med mer än 50 % vid blötläggning i 30 minuter (Cottrell *et al.*, 2005).

I ett försök att reducera WSC-innehållet i olika sorters hö testades blötläggning i 20 minuter, 40 minuter, 3 timmar och 16 timmar i kallt vatten (8°C). Provvolymer var 2 kg hö och vattenvolymer 24 l. Höproverna ugnstorkades i 60°C och analyserades för torrsubstans,

WSC-halt och lösligt protein. Den resulterande blötläggningssvåtskan samlades och analyserades för innehåll av WSC och lösligt protein. Analysmetod för WSC framgick inte i artikeln och inga P-värden var rapporterade (Longland *et al.*, 2009). Minskningen av WSC-halten framgår i tabell 2. Den största minskningen, på 54 %, uppnåddes efter 16 timmar för en förstaskörd av ängshö. Då uppmättes även en 7 %-ig minskning av lösligt protein. Det verkade inte finnas något samband mellan minskningen av WSC-halt och förlusten av lösligt protein. Det var en stor variation i minskning av WSC-innehåll mellan de olika hösorterna (tabell 2).

Tabell 2. Procentuell minskning av lättlösliga kolhydrater (WSC) i olika hösorter (efter Longland *et al.*, 2009)

Hö	Lättlösliga kolhydrater				
	Före blötläggning	20 minuter blötläggning	40 minuter blötläggning	3 timmar blötläggning	16 timmar blötläggning
	g/kg ts	% förlust	% förlust	% förlust	% förlust
Ängshö rajgräs	135	4	15	22	24
Ekologiskt ängshö	230	4	5	6	16
Blandat ängshö	133	3	7	11	14
Ängshö timotej	221	3	12	15	40
Ängshö rajgräs	124	8	26	43	44
Blandat ängshö	175	9	12	21	46
Ängshö dålig kvalitet	123	2	2	6	9
Grovt ängshö	187	2	5	12	19
Ängshö första skörd	167	7	8	18	54

I en annan studie av hö som blötlagts i 12 h analyserades höproverna med avseende på innehåll av WSC och råprotein (Warr och Petch, 1992). Mängden hö som blötlades vägde 250 g, och dessa prover blötlades i 5 liter kranvatten i 10-litersbehållare. Torrsubstansförlusterna av WSC var 2-4% och för råprotein 1,5-2 %. Halten WSC angavs i g/kg hö och den mättes före och efter blötläggning i både provet och i blötläggningssvåtskan (Warr och Petch, 1992). Resultaten presenteras i tabell 3.

Tabell 3. Halten lättlösliga kolhydrater (WSC) i höprover och dess blötläggningssväska före och efter blötläggning i 12 timmar (efter Warr och Petch, 1992)

Prov	Lättlösliga kolhydrater (g/kg)	
	Före blötläggning	Efter blötläggning
Hö A		
Prov	99,1	- ^a
Blötläggningssväska	0	39,0
Hö B		
Prov	102,7	71,4
Blötläggningssväska	0	24,3
Hö C		
Prov	83,6	46,0**
Blötläggningssväska	0	32,2

^a Värde saknas

**P<0,01

BESTÄMNING AV LÄTTLÖSLIGA KOLHYDRATER I VALLFODER

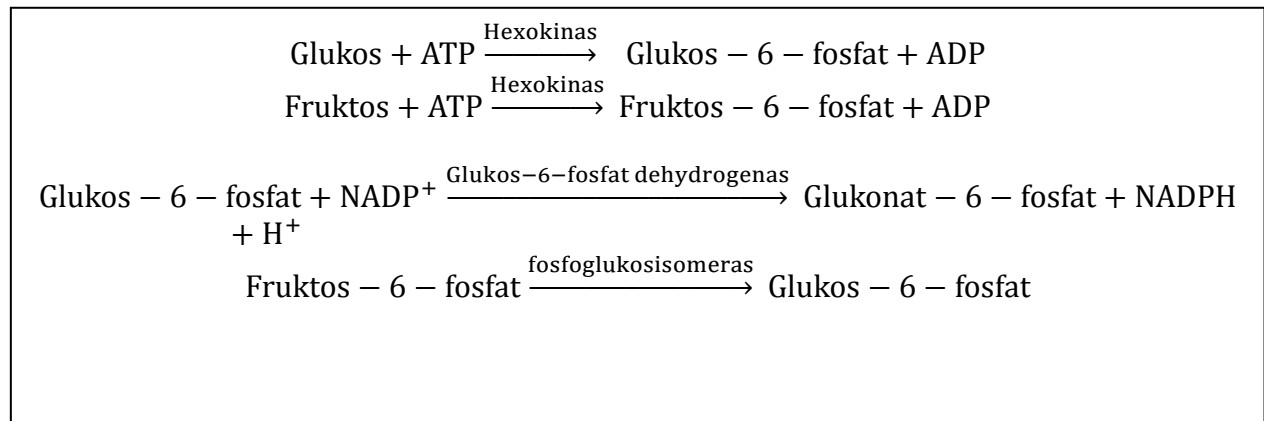
Det finns många olika sätt att bestämma halten lättlösliga kolhydrater i vallfoder. Högupplösande vätskekromatografi (HPLC), nära infraröd spektroskopi (NIRS), enzymatisk-spektrofotometrisk metod och Fourier- transformerad infraröd spektroskopi (FTIR) är några exempel på analysmetoder. I detta avsnitt belyses endast enzymatisk- spektrofotometrisk metod och FTIR spektroskopi, eftersom dessa metoder jämfördes i det praktiska försöket.

Enzymatisk-spektrofotometrisk metod

Enzymatisk analys är en metod som används för att bestämma de lättillgängliga kolhydraterna i växter, foder och livsmedel. Till de lättillgängliga kolhydraterna räknas glukos, fruktos, sukros, fruktan, stärkelse och maltodextriner. I denna analys används en spektrofotometer som mäter absorbansen i provet vid 340 nanometer (nm) våglängd på ljuset. För att få ett mätvärde krävs det att provet har en viss sammansättning och halt av kolhydrater och därför krävs ibland att provet späds med destillerat vatten för att hamna inom detektionsgränsen. Glukos och fruktos kan bestämmas direkt i provet medan sukros och fruktan beräknas efter bestämning av glukos och fruktos och efter sur och enzymatisk hydrolys. Fri glukos och fri fruktos beräknas genom att multiplicera koncentrationerna i extraktet med extraktionsvolymen och ta hänsyn till en eventuell spädning av provet (Larsson & Bengtsson, 1983).

Principen för enzymatisk-spektrofotometrisk analys bygger på att göra glukos och fruktos mätbara genom tillsätta enzymer som ombildar dem till NADPH, som har ett absorbansmaximum vid 340 nm vid spektrofotometrisk analys. Glukos och fruktos fosforyleras till glukos-6-fosfat respektive fruktos-6-fosfat av ATP i närvaro av enzymet hexokinas. Glukos-6-fosfat oxideras därefter av NADP⁺ i närvaro av enzymet glukos-6-fosfat dehydrogenas och bildar glukonat-6-fosfat och NADP. NADP reduceras till NADPH som är mätbar via spektrofotometri. Tillsats av enzymet fosfoglukosisomeras (PGI) gör att fruktos-6-fosfat övergår till glukos-6-fosfat som sedan kan ombildas till NADPH enligt beskrivning ovan (Larsson & Bengtsson, 1983). Dessa steg kan ses i figur 3 nedan. Eftersom sukros består av en glukos- och en fruktosenhet (Berg *et al.*, 2002) och fruktaner består av flera fruktosenheter och en sukrosenhet (McDonald *et al.*, 2002) behöver de först sönderdelas till glukos och fruktos för att kunna haltbestämmas. Värden från dessa mätningar används i en

formel för att räkna ut de olika fraktionerna glukos, fruktos, sukros och fruktan (Larsson & Bengtsson, 1983).



Figur 3. De enzymatiska stegen i analys av lättillgängliga kolhydrater (efter Larsson och Bengtsson, 1983)

Fourier transformerad infraröd spektroskopi

Fourier transformerad infraröd spektroskopi är en analysmetod som vanligen används för att analysera mjölk. Med denna analys får man fram en absorptionsgrad som ger information om kemiska bindningar och molekylära strukturer i ett material. Inom husdjursvetenskapen har FTIR testats i försök för att bestämma koncentrationerna av acetat, propionat och butyrat i vomvätska (Udén & Sjaunja, 2009) och bestämma lösligt socker (glukos, fruktos, sukros och fruktaner) och stärkelse i gräs-klöver vall och ensilage (Udén, 2010). FTIR har också påvisats vara ett bra alternativ till enzymatisk analys vid bestämning av stärkelse som återstår efter fermentation *in vitro* (Udén, 2009).

Olika prepareringsmetoder för FTIR spektroskopi har testats för vallfoder; ugnstorkning vid 60°C, frystorkning och frysning av färsk grönmassa. Färsk eller frystorkade prover, eller kallvattenextrakt, rekommenderas för FTIR analys av lösligt socker (glukos, fruktos, sukros och fruktaner) i vallgröda eller –ensilage. Det vanligaste sättet att preparera prover för analys är att torka dem, men eftersom flyktiga ämnen såsom ammoniak, organiska syror och alkoholer försvinner vid torkning är färsk gröda att föredra. Detta kan göras antingen genom att pressa ut vätska, t ex med hjälp av en hydraulisk press, direkt från provet eller efter tillsats av en känd mängd vatten. Det är känt att lösligt socker och stärkelse också försvinner vid torkning varför färsk gröda är att föredra. Udén (2010) ansåg att FTIR analys av lösligt socker i vall var ett bra alternativ till enzymatisk- spektrofotometrisk analys och dessutom en billigare analysmetod. Bara en preparering krävs före FTIR vilket gör metoden snabbare, kostnadseffektivare och samtidig analys av socker och fermentationsprodukter kan göras (Udén, 2010).

HÄSTENS DIGESTION AV LÄTTLÖSLIGA KOLHYDRATER

De lösliga kolhydraterna i spannmål och vallfoder definieras oftast som icke-strukturella kolhydrater. Icke-strukturella kolhydrater kan dock både vara hydrolyserbara eller fermenterbara kolhydrater i hästens digestionssystem (Hoffman *et al.*, 2001; Frape, 2004). Hydrolyserbara kolhydrater finns främst i spannmål men också i vallfoder (Hoffman *et al.*, 2001). Glukos och fruktos tas upp som de är, sukros och stärkelse är hydrolyserbara kolhydrater som kan brytas ned enzymatiskt. De spjälkas i hästens mag-tarmkanal av enzymer; α -glukosidas och β -galaktosidas. Alfaamylas spjälkar stärkelse och sukras spjälkar sukros. Glukoamylas, maltas och isomaltas spjälkar dextriner, från stärkelsespjälkningen, till glukos. Betagalaktosidas spjälkar laktos hos föl som dricker stömjölk (Frape, 2004).

Hästar har i princip inget α -amylas i saliven och därför sker ingen spjälkning av stärkelse i munhålan. I magsäcken finns magsyra som hydrolyserar kolhydrater till en viss del. I tunntarmen spjälkas stärkelse av α -amylas från pancreas. Kolhydrater som bryts ner i tunntarmen absorberas som monosackarider. Absorberad glukos kan användas direkt som energi eller lagras in. Lagringsformen av kolhydrater hos djur är glykogen som främst lagras i levern och i musklerna (NRC, 2007). Hydrolyserbara kolhydrater kan även fortsätta till grovtarmen, beroende på smältbarheten och passagehastigheten av fodret, där de fermenteras av mikroorganismer om de inte redan har brutits ned och tagits upp i tunntarmen (Frape, 2004).

Lösliga fibrer (t.ex. pektin), vissa oligosackarider (fruktaner, galaktaner), cellulosa, hemicellulosa och en del stärkelse är fermenterbara kolhydrater som används som energisubstrat av mikroorganismer i hästens grovtarm, vilka producerar de flyktiga fettsyror (Volatile Fatty Acids, VFA) ättiksyra, propionsyra och smörsyra. De flyktiga fettsyror används som energi (Frape, 2004; NRC, 2007). Stärkelse som inte är digerbar av enzymer pga. sin struktur kan istället fermenteras i grovtarmen. Detta ökar VFA-produktionen, speciellt mängden propionsyra, samt orsakar mjölksyrabildning vilket sänker pH-värdet (Frape, 2004). En sur miljö i grovtarmen gynnar tillväxten av mjölksyrabildande bakterier (LAB). Då bildas ytterligare mjölksyra och pH sjunker ytterligare. Detta kan orsaka acidosis som ofta ger fång som följd (Al Jassim *et al.*, 2005). En ökad proliferation av grampositiva bakterier (Streptococci och Lactobacilli) kan också ske när fruktaner kommer till grovtarmen (Bailey *et al.*, 2003).

SJUKDOMAR RELATERADE TILL ÖVERUTFODRING AV LÄTTLÖSLIGA KOLHYDRATER HOS HÄST

Lättlösliga kolhydrater kan, i större mängder vid ett och samma tillfälle, ge störningar i grovtarmens mikroflora och orsaka sjukdomar. Överutfodring av WSC och/eller stärkelse under en längre tid kan orsaka metaboliska sjukdomar som insulinresistens och EMS, vilka båda kan leda vidare till fång. Dessa typer av hästar behöver utfodras med foder som innehåller låg halt WSC för att deras hälsa inte ska förvärras (Frape, 2010). Hästar som fått diagnosen Cushings syndrom (Pituitary pars intermedia dysfunction, PPID), en tumör i hypofysen, har en störd ämnesomsättning som förvärras av ett högt intag av WSC, vilket innebär att de också behöver utfodras med foder med lågt innehåll av WSC (Grenager, 2010).

Insulinresistens

Glukos är en viktig källa till energi för de flesta av kroppens vävnader. En normal glukosnivå hos friska ponnyer och hästar ligger runt 2,8-3,3 mmol/l resp. 4,4-4,7 mmol/l i blodet. Glukoskoncentrationen i blodet varierar under dygnet då den t.ex. ökar ca. 2 h efter utfodring (Frape, 2004). Om upptagen glukos inte behövs direkt i kroppens vävnader lagras den in som glykogen eller omvandlas till triglycerider. Inlagringen av glukos till vävnader stimuleras av peptidhormonet insulin. Insulin produceras av β -celler i bukspottkörteln. Ett insulinpåslag sker vid ökad glukosnivå i blodet. Glukosmolekyler måste transporteras genom cellmembranet av speciella transportproteiner som kallas GLUT-molekyler. GLUT-4, transportproteinet i skelettmuskler, är beroende av insulin som reglerar intaget av glukos i cellen (Sjaastad *et al.*, 2003). Insulin påverkar även inlagring av fett genom aktivering av lipoproteinet lipas i fettvävnaden. Vid höga nivåer av glukos i plasman ökar insulinivåerna vilket minskar frisättningen av fria fettsyror (non esterified fatty acids, NEFA) från levern. Detta får till följd att mobiliseringen av fettreserver minskar (Sjaastad *et al.*, 2003; Frape, 2004). Detta är en förklaring till varför konstant höga glukosnivåer i blodet bidrar till en ökad fettinlagring, ökad glykogeninlagring och minskad fettmobilisering.

Insulinresistens innebär ett försämrat glukosupptag i cellerna pga. att cellens receptorer inte längre är känsliga för insulin, dvs. minskad insulinkänslighet. Detta gör att både glukos- och insulinivåerna i blodet blir höga. Vid insulinresistens krävs mer insulin för att insulinreceptorn på cellen ska kunna ta upp glukos från blodet. Ökad insulinivå i blodet inhiberar också mobilisering av fettsyror i fettvävnaden. Vid fetma har fettcellerna lagrat in så mycket fett att IR uppstår i cellerna vilket ger både lokal IR och IR i hela kroppen (Sjaastad *et al.*, 2003).

Det finns ett samband mellan fetma och insulinkänslighet. Feta hästar har lägre insulinkänslighet (dvs är insulinresistenta) vilket har konstaterats i en studie där kraftigt överviktiga hästar med hullbedömningspoäng 7-8, medelöverviktiga 6 och normalviktiga 5 (Henneke, 1985) fullblodshästar utfodrades med vallfoder kompletterat med kraftfoder rikt på stärkelse och socker eller rikt på fett och fibrer. Hästarna hade lägre insulinkänslighet när de utfodrades med stärkelse och socker jämfört med fibrer och fett, särskilt de normalviktiga. De överviktiga hästarna var insulinresistenta. Att behålla normal vikt och undvika spannmålsbaserade kraftfoder rika på socker och stärkelse är fördelaktigt för överviktiga hästar för att minska risken att de utvecklar insulinresistens och andra metaboliska sjukdomar (Hoffman *et al.*, 2003).

Fång

Fång är en sjukdom där inflammation och nedbrytning av celler i hovlamellen (vävnaden mellan hovväggen och hovbenet) uppkommer. Inflammationen och cellnedbrytningen gör att hovlamellen brister, vilket orsakar separation av hovbenet och hovväggen från varandra. Hovbenets spets kan då tränga ned i hovkapseln och i värsta fall penetrera sulan. Detta är mycket smärtsamt för hästen (Elliot & Bailey, 2006). Det finns många teorier och förklaringar till varför fång uppstår. Utfodringsrelaterad fång har ett samband med plötsliga förändringar i foderstaten och med ett högt intag av icke-strukturella kolhydrater, dvs. stärkelse och/eller lättlösliga kolhydrater, liksom med intag av bl a svart valnöt eller andra giftiga eller olämpliga växter (Frape, 2010).

På längre sikt har fång också en relation med överutfodring, fetma och insulinresistens (IR). Insulinresistenta hästar är känsliga för foderstater som ger ett högt insulinpåslag, dvs. foder med mycket WSC eller stärkelse. Lokal IR i hoven har ansetts orsaka att glukos inte kan tas upp via glukotransportproteinet i lamellvävnaden, och därmed orsaka att lamellerna brister. Dock har studier visat att glukotransportproteinet GLUT-1 som finns i lamellen inte är beroende av insulin, vilket innebär att glukosupptaget i hovlamellen inte påverkas av minskad insulinkänslighet (Asplin *et al.*, 2007; Asplin *et al.*, 2011).

Högt intag av fruktaner kan orsaka en störd fermentation i grovtarmen. När fruktaner fermenteras av grampositiva bakterier i grovtarmen produceras mjölksyra. Mjölksyran sänker pH-värdet i grovtarmen och detta gör att vissa bakterier i tarmen dör vilket får till följd att endotoxiner frigörs. Mjölksyran och det låga pH-värdet skadar tarmväggens epitel och det gör att endotoxinerna kan tas upp i blodet och orsaka skador i hovlamellen (Elliott & Bailey, 2006). Grampositiva bakterier, streptococci och lactobacilli, som fermenterar kolhydrater kan även producera aminer genom dekarboxylering av aminosyror. Aminerna kan orsaka perifera kärlsammandragningar och därmed också bidra till skador i hovlamellen (Bailey *et al.*, 2003; Elliott & Bailey, 2006). Oligofruktos, en typ av fruktaner, kan bara brytas ned av mikroorganismer i grovtarmen då hästar saknar enzymer som kan spjälka oligofruktos. När hästar får en överdos av oligofruktos ökar koncentrationen av D-laktat i blodet vilket beror på den snabba proliferationen av D-laktatproducerande organismer i grovtarmen (van Eps & Pollitt, 2006). *L. salivarius* och *L. mucosae* är mjölksyrabildande bakterier i grovtarmen som kan dekarboxylera aminosyror och bilda potentiella vasoaktiva aminer under gynnsamma förhållanden för mikrobiell fermentation (Bailey *et al.*, 2003).

Equine metabolic syndrome

Equine metabolic syndrome beskriver ett sjukdomstillstånd hos en häst som är överviktig, har fettansamling längs mankammen, insulinresistens och därmed är i riskzonen för att få fång. Dessa tillstånd påverkar varandra och det kan bero på både genetiska och/eller miljömässiga faktorer. Hos hästar gäller oftast att ju mer insulinresistenta de blir, desto mer insulin producerar de, och bara i särskilda fall kollapsar pankreas vilket leder till typ 2 diabetes (Frank, 2009).

Hästar med EMS ska behandlas med förebyggande åtgärder, då viktminskning av feta hästar är viktigast. Hästens diet ska anpassas med hänsyn till det totala energiintaget och intaget av icke-strukturella kolhydrater, dvs. stärkelse och WSC. Detta gör man främst genom att ta bort allt spannmålsbaserat foder i hästens diet och begränsa tillgången till bete. Motion är en annan viktig faktor för såväl viktminskning som förbättrad insulinkänslighet, då motion jämnar ut glukosnivåerna i blodet oberoende av insulin. Motion förbättrar även insulinkänsligheten hos muskler och fettvävnad då GLUT-4 aktiviteten förbättras. Hästar med EMS löper större risk att drabbas av fång när de utsätts för överskott av lättlösliga kolhydrater eftersom höga insulinnivåer orsakar kärlsammandragningar i hoven (Frank, 2009).

Equine Cushing's syndrome

Sjukdomen Equine Cushings syndrome eller pituitary pars intermedia dysfunction (PPID) uppkommer oftast under den senare delen av hästens liv. Det är en godartad tumör, ett adenom, i hypofysen. Symptomen är onormal pälsättning, ingen pälsfällning på sommaren, muskeldegeneration och sämre immunförsvar. Tumören gör att *pars intermedia*, en tunn bit av vävnad som är en del av den bakre hypofysen, blir överaktiv, vilket resulterar i ett

överskott av adrenokortikotropt hormon (ACTH) vilket i sin tur leder till en ökad produktion av kortisol i binjurarna. Höga halter kortisol ökar halten glukos i blodet pga. att kortisol stimulerar glukoneogenes i levern och ökar nedbrytning av fett i fettväven. Detta ökar glukosnivåerna i blodet och gör att insulin måste utsöndras oftare och i högre halt. Detta kan leda till insulinresistens. Hästar med onormalt höga nivåer av insulin och kortisol i blodet får lättare fång. Behandlingen för denna sjukdom är medicinering men också att överviktiga hästar ska gå ner i vikt. Motion är viktigt för att förbättra insulinkänsligheten och för viktminskning. Fodret ska ha ett lågt innehåll av icke-strukturella kolhydrater, alltså WSC och stärkelse, för att hålla insulinhalten i blodet på en låg/normal nivå (Grenager, 2010). Energinivån i fodret bör komma från källor som inte bidrar till stora mängder glukos i blodet, exempelvis fibrer (NRC, 2007).

EGEN STUDIE

SYFTE

Syftet med den egna studien var att undersöka vilka metoder som kan reducera halten lättlösliga kolhydrater i vallfoder. Effekten av blötläggning av vallfoder innan utfodring, effekt av tillsats av ensileringsmedel, effekt av konserveringsmetod och effekt av lagringstid på den totala WSC-halten undersöktes. Ytterligare ett syfte med studien var att utvärdera hur väl FTIR analys av lättlösliga kolhydrater i vallfoder stämde överens med enzymatisk-spektrofotometrisk analysmetod som används rutinmässigt av detsamma.

MATERIAL OCH METODER

Skörd och inläggning av grönmassa

Grönmassan slogs med slåtterkross den 15 juni 2010 på förmiddagen. Vallen var 4 år gammal vid skördetillfället. Vallens botaniska sammansättning var timotej (*Phleum pratense*), ängssvingel (*Festuca pratensis*), engelskt rajgräs (*Lolium perenne*), rödklöver (*Trifolium pratense*) och maskros (*Taraxacum officinale*). Vädret vid skördetillfället var molnigt och temperaturen låg runt +15°C. De följande två dagarna var soliga. Grönmassan förtorkades på slag till ca 40 % torrs substans (ts) för inläggning av ensilage och till ca 60 % ts för inläggning av hösilage. Grönmassa som skulle bli hö förtorkades till ca 80 % ts på fältet. Ensilage och hösilage packades i 25 liters försökssilor i rostfritt stål med hjälp av en hydraulisk press, totalt 48 silor fördelade jämnt mellan ensilage och hösilage, med och utan osmotoleranta mjölksyrabakterier "Feedtech Silage F3000" (DeLaval Sales AB, Tumba, Sverige) som tillsatsmedel. Doseringen skedde efter tillverkarens råd; 0,003 g/kg grönmassa. Ensileringsmedlet innehöll fyra bakteriestammar, *Lactobacillus plantarum* Milab 393, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* och *Lactococcus lactis* (DeLaval, 2011). Den grönmassa som inte behandlades med mjölksyrabakterier utgjorde kontroller. Silorna försågs med lock och därefter tätades de noga med silikon och plastfilm för att få en syretät silo. På locket av silon fanns ett jäsrör som fylldes med vatten. Höet pressades till rektangulära, små höbalar på en vikt av ca 11 kg och sluttorkades på planbottentork till ca 85 % ts. Därefter täcktes höet med halm.

Under de första veckorna efter inläggning av grönmassan vägdes alla silor för att följa fermentationsförlusterna. Vattennivåerna i jäsrören, som var fyllda till hälften, kontrollerades samtidigt vid vägningen under de första veckorna av lagringen och fylldes på vid behov. Silorna vägdes dagligen under de första 4 dagarna. Därefter vägdes de med några dagar

mellanrum, efter 2 månaders lagring och vid öppningen av silorna efter 3 respektive 6 månaders lagring. Totalt var det 13 mättillfällen för alla silor.

Provtagning och blötläggning av foder

I samband med inläggningen av grönmassa togs prov för analys av torrsbstanshalt (ts), koncentration av lättlösliga kolhydrater (WSC) och mikrobiologisk sammansättning. Efter 3 och 6 månaders lagring öppnades 12 silor och 3 höbalar vid respektive tillfälle. Vid provtagningstillfället efter 3 månaders lagring samlades prov från varje silo för mikrobiologisk och näringsmässig analys. Därefter blötlades ensilaget, hösilaget och höet i kranvatten. För ensilage och hösilage användes de silor som fodret hade konserverats i som behållare för blötläggningen, och för höet användes rengjorda och tomma likadana silor för blötläggning. Fodret i varje silo motsvarade ca 1 kg ts och 17 l kranvatten/silo användes för blötläggning. Vattnet täckte allt foder. Kranvattnets temperatur mättes med termometer under upptappningen av kallvatten och temperaturen varierade mellan 5°C till 18°C under upptappningen. De första silorna fick 18°C varmt vatten, därefter sjönk vattnets temperatur ner till 5°C. Blötläggningens vattens temperatur för respektive silo framgår i tabell 4. Efter 12 timmars blötläggning togs prov på blötläggningssväska och på foder från samtliga silor. Dessa prover förvarades sedan i fryskyl i -18 °C. Efter 24 timmars blötläggning upprepades samma provtagning som efter 12 timmar, men med ett tillägg av ett prov som borrades ut med en steril ensilageborr för mikrobiologisk analys. Dessutom kontrollerades mängden blötläggningssväska i varje silo efter avslutad blötläggning genom att väga vätskan. Vid det sista provtagningstillfället efter 6 månaders lagring togs prov enbart för WSC-analys och ts-bestämning, och ingen blötläggning gjordes.

Tabell 4. Vattentemperatur (°C) i början av blötläggningen, efter 12 timmars blötläggning och efter 24 timmars blötläggning av foder lagrat i 3 månader

Silo	Fodertyp	Temperatur		
		Blötläggning 0 h	Blötläggning 12 h	Blötläggning 24 h
1	Ensilage, kontroll	18	11	16
2	Ensilage, kontroll	15	15	15
3	Ensilage, kontroll	11	15	15
13	Ensilage, ens. medel	10	14	14
14	Ensilage, ens. medel	10	14	14
15	Ensilage, ens. medel	10	14	14
25	Hösilage, kontroll	9	13	14
26	Hösilage, kontroll	8	13	15
27	Hösilage, kontroll	8	14	15
37	Hösilage, ens. medel	8	12	14
38	Hösilage, ens. medel	6	13	15
39	Hösilage, ens. medel	5	13	15
Hö A	Hö	7	13	14
Hö B	Hö	7	12	14
Hö C	Hö	7	13	15

Preparering av prover

För att bestämma ts-halten i samtliga prover vägdes prov upp i aluminiumtråg och torkades i torkskåp i ca 18 h vid 55 °C. Efter torkningen luftades proverna ett par timmar och vägdes därefter. Förtorknings-ts erhölls genom uträkning: $\text{utvikt-tara} = \text{netto} \rightarrow (\text{netto/invägt}) * 100 = \% \text{ torrsubstans}$. Proverna som togs efter 3 månaders lagring innan blötläggning maldes i en hammarkvarn genom ett såll med 1 mm maskstorlek. Dessa prover torkades ytterligare i 20 timmar i 103°C och användes för vidare analys av näringsinnehållet.

Samtliga prover, dvs. från alla provtagningstillfällen, preparerades för WSC-analys. Dessa prover erhöles genom att späda provet med destillerat vatten och pressa ut saften, så kallat pressvatten, i en hydraulisk press. Foderprov som togs innan blötläggning vid öppningen efter 3 månaders lagring späddes 2:1 (200 g destillerat vatten och 100 g prov). Prov från silor lagrade i 6 månader hade samma spädningsfaktor. Blötlagda foderprover från 12 h blötläggning respektive 24 h blötläggning, späddes 1:1 (100 g destillerat vatten och 100 g prov). Efter spädningsen frystes proverna över natten, och morgonen efter togs de fram i rumstemperatur för att tina. Proverna pressades sedan som beskrivits ovan. Pressvattnet analyserades med enzymatisk- spektrofotometrisk metod (Larsson & Bengtsson, 1983) där alla WSC-fraktioner samt totala WSC bestämdes, samt med FTIR spektroskopi (Udén, 2010) för att bestämma totala WSC. Pressvattnet användes även för att bestämma pH, flyktiga fettsyror (VFA) och innehållet av ammoniumkväve.

Analyser

Prov från grönmassan och prov från ensilage, hösilage och hö lagrade i 3 månader analyserades för samtliga variabler på det sätt som beskrivs nedan. Ensilage, hösilage och hö lagrat i 6 månader analyserades bara med avseende på WSC-halt och ts-halt. Ts-halten bestämdes genom torkning i värmeskåp. Lätlösliga kolhydrater (WSC inkluderande glukos, fruktos, sukros och fruktaner) analyserades med enzymatisk-spektrofotometrisk metod (Larsson & Bengtsson, 1983) och med FTIR-spektroskopi (Udén, 2010). Energiinnehållet bestämdes genom VOS-analys (Vomvätskelöslig organisk substans) (Lindgren, 1983). Råprotein (rp) bestämdes genom Kjeldahlmetod och det smältbara råproteinet (smb rp) räknades fram genom en smältbarhetsformel (Pålson, 1973). Innehållet av neutral detergent fiber (NDF) analyserades enligt Chai och Udén (1998). Mikrobiologisk sammansättning bestämdes genom odling och kvantitativ bestämning av jäst och mögel, enterobakterier, klostridier och mjölksyrabakterier, vilket gjordes på Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA), Uppsala. Ensilage och hösilage lagrat i 3 månader analyserades dessutom med avseende på pH med konventionell elektrodteknik, VFA, mjölksyra och alkoholer med högupplösande vätskekromatografi (HPLC) och ammoniumkväve med destillering/autoanalyser för att kontrollera konserveringsresultatet.

Enzymatisk- spektrofotometrisk analys

För att analysera innehållet av WSC i ensilage, hösilage och hö användes en enzymatisk-spektrofotometrisk metod (Larsson & Bengtsson, 1983). Pressvattenprover som förvarats frysta togs fram för att tina i rumstemperatur. Proverna centrifugerades i ca 5 minuter för att sedimentera partiklar. Därefter behövde provextraktet spädas för att det skulle få en lämplig koncentration som var inom mätområdets intervall för sockerfraktionerna. Proverna som hade spädnings 2:1 späddes ytterligare med destillerat vatten 20 gånger. Lika delar av det spädda provet och lika delar av 0,074 molar svavelsyra (H₂SO₄) blandades och inkuberades i 80°C vattenbad i 70 minuter för sur hydrolys. Proverna kylades sedan snabbt. Slutbestämningen av

proverna gjordes enligt metodbeskrivningen (Larsson & Bengtsson, 1983) som finns beskriven i litteraturdelen av detta examensarbete.

Fourier transformerad infraröd analys

Inför FTIR analysen pH-justerades provextraktet till ca pH 7 genom titrering med 1 molar natriumhydroxid (NaOH) under omrörning och med hjälp av avläsning av pH med elektrodteknik. Därefter centrifugerades proverna i 3000 G i 6 minuter för att sedimentera partiklar. Provlösningarna skannades därefter i en FOSS MilkoScan FT120 varvid två spektra per prov erhöles genom att mäta absorbansen vid olika våglängder och använda en kalibreringsfunktion. Vid skanningen användes ca 4 ml prov (Udén, 2010).

Beräkningar

Halten lättlösliga kolhydrater som erhöles efter den enzymatisk- spektrofotometriska analysen samt efter FTIR-analys angavs i g/L för varje fraktion, dvs. fri glukos, fri fruktos, sukros och fruktan. Dessa värden räknades om till g/kg ts genom att ta hänsyn till varje provs respektive ts-halt och spädning som gjordes vid pressvattenprepareringen.

Ex. 40,8% ts i provet. 100 g prov + 200 g destillerat vatten (spädning 2:1). 40,8% av 100 g = 40,8 g ts i provet.

→ 100 g - 40,8 g = 59,2 g vätska i provet.
+ 200 g spädning → 200 g + 59,2 g = 259,2 g = 259,2 ml

Ex. 4,4 g glukos/L → $4,4/1000 = 0,0044$ g/ml
 $0,0044 * 259,2 \text{ ml} = 1,14048$ g glukos i provet.
 $1,14048/40,8 = 0,0279$ g/g ts → $0,0279 * 1000 \text{ g} = 27,95$ g/kg ts

Vid spädning 1:1 räknades värdet fram genom att addera vätskan i provet med 100 g istället för 200 g.

För att räkna ut den procentuella minskningen eller ökningen av halten lättlösliga kolhydrater i ensilage och hösilage efter blötläggning användes följande formel:

$100 - ((\text{medelvärde av behandling vid respektive blötläggningstid} / \text{medelvärde av behandling innan blötläggning}) * 100) = \% \text{ minskning}$

Den procentuella minskningen eller ökningen av halten WSC i hö räknades ut genom följande formel:

$100 - ((\text{värde efter respektive blötläggningstid} / \text{värde före blötläggning}) * 100) = \% \text{ minskning/ökning}$

Statistisk analys

Variansanalys utfördes i statistikprogrammet SAS med General linear models (GLM) procedur. Signifikansnivån för skillnader i medelvärden var $P < 0,05$.

Den statistiska modell som användes för varje fodertyp (ensilage, hösilage och hö) var:

$Y_{ijkl} = \mu + (\text{ensileringsmedel})_i + (\text{blötläggning})_j + (\text{lagringstid})_k + (\text{ensileringsmedel} * \text{blötläggning})_{ij} + (\text{ensileringsmedel} * \text{lagringstid})_{ik} + (\text{blötläggning} * \text{lagringstid})_{jk} + (\text{error})_{ijkl}$

$$Y_{ijkl} \approx \text{IND}(\mu_i, \sigma_e)$$

IND= independently normally distributed

RESULTAT OCH DISKUSSION

Effekt av lagringstid

WSC-värden i ensilage var lägre efter 3 månaders lagring jämfört med grönmassan. Ingen skillnad fanns dock i totala WSC för ensilage lagrat i 3 månader respektive 6 månader (tabell 5). I hösilage (tabell 6) och i hö (tabell 7) var totala WSC lägst efter 6 månaders lagring och högst i grönmassan. Dock var skillnaden mellan 3 och 6 månaders lagring för dessa foder relativt små, då t ex den totala halten WSC efter 3 månader var 5,5 % i jämförelse med 4,8 % efter 6 månader för hösilage (tabell 6). Det är tveksamt om denna marginal skulle ha någon större betydelse vid utfodring till en häst. Den största procentuella minskningen av totala WSC från grönmassa till lagrat foder kunde ses hos hö efter 6 månaders lagring (tabell 7) då även det lägsta innehållet av WSC uppmättes (tabell 7-8). Lagring i 6 månader gav lägst WSC-värde för hö då alla fodertyper jämfördes och lagringstiden hade ingen effekt på ensilage och hösilage (tabell 8). Det fanns inga interaktioner mellan lagringstid och användning av ensileringsmedel på halten WSC i ensilage eller hösilage.

Effekten av lagringstid på fodrets kemiska sammansättning redovisas i tabell 5, 6 och 7 för ensilage, hösilage respektive hö. Ensilage hade ett statistiskt högre energivärde efter 3 månaders lagring jämfört med grönmassa (tabell 5) men skillnaden var dock liten. Askhalten i ensilage (tabell 5) och i hösilage (tabell 6) var högre i lagrat foder än i grönmassan. Det fanns inga skillnader i aska, råprotein, smältbart råprotein, NDF och energi i hö före och efter lagring (tabell 7).

Tabell 5. Jämförelse av näringsinnehåll och halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) i grönmassa för ensilage och ensilage lagrat i 3 och 6 månader

Variabel	Grönmassa	Lagring 3 månader	Lagring 6 månader	SEM	P lagringstid
Torrsubstans g/kg	453 ^a	399 ^b	394 ^b	11,2	0,003
Aska	70	77	.	1,77	0,02
Råprotein	114	127	.	4,99	0,08
Smältbart råprotein	76	88	.	4,76	0,09
Neutral detergent fiber (NDF)	549	566	.	7,0	0,09
Energi (MJ ME/ kg ts)	10,0	10,3	.	0,09	0,045
Glukos	43,8 ^a	28,4 ^b	28,1 ^b	2,19	0,0001
Fruktos	20,3 ^a	8,7 ^b	6,7 ^b	1,21	<0,0001
Sukros	40,6 ^a	1,2 ^b	1,7 ^b	1,01	<0,0001
Fruktaner	4,5 ^a	0,4 ^b	1,1 ^b	0,95	0,01
Lättlösliga kolhydrater	109,2 ^a	38,6 ^b	37,5 ^b	3,90	<0,0001

^{a, b, c} Olika bokstäver inom samma rad anger signifikans vid det angivna P-värdet

Tabell 6. Jämförelse av näringsinnehåll och halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) i grönmassa för hösilage och hösilage lagrat i 3 och 6 månader

Variabel	Grönmassa	Lagring 3 månader	Lagring 6 månader	SEM	P
Torrsubstans g/kg	652 ^a	610 ^b	622 ^b	8,12	0,004
Aska	66	73	.	2,2	0,02
Råprotein	115	116	.	2,0	0,61
Smältbart råprotein	77	78	.	2,0	0,69
Neutral detergent fiber	575	585	.	5,8	0,22
Energi (MJ ME/ kg ts)	9,8	10,0	.	0,11	0,21
Glukos	43,8 ^a	34,6 ^b	32,6 ^b	2,01	0,002
Fruktos	20,3 ^a	17,5 ^a	11,3 ^b	1,5	0,0007
Sukros	40,6 ^a	1,4 ^b	0,1 ^b	0,85	<0,0001
Fruktaner	4,5	1,6	4,0	1,35	0,15
Lättlösliga kolhydrater	109,2 ^a	55,3 ^b	48,0 ^c	3,40	<0,0001

^{a, b, c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet

Tabell 7. Jämförelse av näringsinnehåll och halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) i grönmassa för hö och hö lagrat i 3 och 6 månader

Variabel	Grönmassa	Lagring 3 månader	Lagring 6 månader	SEM	P
Torrsubstans g/kg	732 ^a	843 ^b	856 ^b	7,2	<0,0001
Aska	70	73	.	4,2	0,60
Råprotein	106	103	.	4,9	0,72
Smältbart råprotein	68	66	.	4,6	0,77
Neutral detergent fiber	564	579	.	11,9	0,41
Energi (MJ ME/ kg ts)	9,7	9,8	.	0,12	0,73
Glukos	32,0 ^a	16,3 ^b	12,2 ^b	1,45	0,0002
Fruktos	17,9 ^a	10,3 ^b	5,0 ^c	0,73	<0,0001
Sukros	51,6 ^a	1,4 ^b	Nd ^b	0,92	<0,0001
Fruktaner	3,8	1,5	1,4	0,74	0,11
Lättlösliga kolhydrater	105,3 ^a	29,5 ^b	18,6 ^c	2,33	<0,0001

^{a, b, c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet

Tabell 8. Effekt av lagringstid på halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) i de olika fodertyperna ensilage, hösilage och hö lagrat i 3 och 6 månader

Variabel	Ensilage 3 månader	Ensilage 6 månader	Hösilage 3 månader	Hösilage 6 månader	Hö 3 månader	Hö 6 månader	SEM	P konserveringsmetod	P lagringstid
Torrsubstans g/kg	399 ^a	394 ^a	610 ^b	622 ^b	842 ^c	856 ^c	9,4	<0,0001	0,28
Glukos	28,4 ^a	28,1 ^a	34,8 ^b	32,6 ^b	16,3 ^c	12,2 ^c	2,6	<0,0001	0,14
Fruktos	8,7 ^a	6,7 ^a	17,5 ^b	11,3 ^{a,b}	10,3 ^a	5,0 ^a	1,63	<0,0001	0,0004
Sukros	1,2	1,7	1,4	0,1	1,4	Nd [§]	0,60	0,20	0,09
Fruktaner	0,4 ^a	1,1 ^a	1,6 ^a	4,0 ^b	1,5 ^a	1,4 ^a	0,90	0,01	0,11
Lättlösliga kolhydrater	38,6 ^a	37,5 ^a	55,3 ^b	48,0 ^b	29,5 ^a	18,6 ^c	3,76	<0,0001	0,02

^{a, b, c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet för konserveringsmetod

^{A, B} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet för lagringstid

[§] Ej detekterbart

Effekt av konserveringsmetod

Konserveringsmetod hade effekt på totala halten WSC då ensilage och hö hade lägre halt jämfört med hösilage som hade högst WSC- innehåll efter 3 månaders lagring. Hösilage hade dessutom den högsta glukos- och fruktoshalten (tabell 9). Att ensilage hade lägre WSC-värden än hösilage beror troligen på den fermentation som skett av mikroorganismer. Detta kan härledas till fermentationsvariablerna för ensilage i tabell 9 där halten bildad mjölksyra och ättiksyra är betydligt högre i ensilage jämfört med hösilage och hö. Hö hade högre värden av jäst, mögel och enterobakterier jämfört med de andra fodertyperna (tabell 9). Dessa mikroorganismer kan förklara varför hö hade lägre WSC än hösilage pga. att WSC förbrukats under aerob respiration. Efter 6 månaders lagring innehöll hö lägst WSC och den högsta WSC-halten återfanns fortfarande i hösilage (tabell 8). Enligt McDonald *et al.* (2002) är WSC- halten lägre i ensilage om man jämför med hö, men så var det alltså inte i det här försöket. Detta kan bero på att förekomsten av olika gräsarter skiljer sig mellan länder. McDonald *et al.* (2002) är en engelsk bok där den vanligaste grässorten är engelskt rajgräs, vilken är känd för sitt höga innehåll av WSC. I Sverige är den vanligaste gräsarten timotej som ofta används i vallar, speciellt till hö. Att hö hade lägst WSC- halt kan också bero på den enzymatiska aktiviteten vid förtorkning då WSC används som energi då mikroorganismer respirerar (McDonald *et al.*, 2002). Hö hade dessutom högre halter av jäst, mögel och enterobakterier som förbrukar WSC och även andra näringsämnen under lagringen vilket framgår i tabell 9. En mer trolig felkälla till varför hö hade lägre WSC-värden än ensilage kan vara provprepareringen innan WSC-analysen. Eftersom hö har styvare stjälkar än ensilage kan mindre WSC ha lösts ut i pressvattnet och därmed blir de analyserade värdena för hö lägre. Det fanns inga interaktioner mellan lagringstid och konserveringsmetod.

Hö hade lägst halt av råprotein, smältbart råprotein och energi då det jämfördes med ensilage och hösilage. Halten jäst, mögel och enterobakterier i hö var högre i jämförelse med ensilage och hösilage efter 3 månaders lagring (tabell 9).

Tabell 9. Näringsinnehåll och fermentationsprodukter (g/kg ts), mikrobiologisk sammansättning (log CFU/g) och innehåll av lösliga kolhydrater (g/kg ts) i ensilage, hösilage och hö vid öppning efter 3 månaders lagring

Variabel	Ensilage	Hösilage	Hö	SEM	P
Torrsubstans g/kg	399 ^a	610 ^b	842 ^c	8,5	<0,001
pH	4,84 ^a	5,38 ^{a,b}	5,90 ^b	0,295	0,03
Aska	77	73	73	3,1	0,54
Råprotein	127 ^a	117 ^a	103 ^b	4,8	0,006
Smältbart råprotein	88 ^a	78 ^a	66 ^b	4,6	0,007
Neutal detergent fiber	566	585	579	9,3	0,17
Energi (MJ ME/ kg ts)	10,3 ^a	10 ^b	9,8 ^b	0,12	0,009
Ammoniaktal	3,6 ^a	2,1 ^b	0,7 ^c	0,42	0,0003
Mjölksyra	39,5 ^a	12,2 ^b	1,3 ^b	9,51	0,01
Ättiksyra	4,2 ^a	1,6 ^b	0,2 ^b	0,77	0,002
Propionsyra	1,6	0,2	0,2	0,57	0,05
Etanol	8,6 ^a	3,7 ^b	0,2 ^c	1,16	0,0002
Myrsyra	0,4 ^a	1,0 ^b	0,2 ^a	0,19	0,004
Jäst	2,3 ^a	2,7 ^a	4,6 ^b	0,37	0,001
Mögel	1,8 ^a	1,7 ^a	5,3 ^b	1,18	<0,0001
Enterobakterier	1,1 ^a	0,7 ^a	5,6 ^b	0,37	<0,0001
Mjölksyrabakterier	6,87 ^a	6,27 ^b	2,87 ^c	0,20	<0,0001
Klostridiesporer	1,9	1,9	1,7	1,17	0,54
Glukos	28,4 ^a	34,8 ^b	16,3 ^c	2,52	0,0002
Fruktos	8,7 ^a	17,5 ^b	10,3 ^a	2,09	0,003
Sukros	1,2	1,4	1,4	0,64	0,96
Fruktaner	0,4	1,6	1,5	0,60	0,16
Lösliga kolhydrater	38,6 ^a	55,3 ^b	29,5 ^a	4,20	0,0006

^{a, b, c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet

Effekt av ensileringsmedel

Ensilage och hösilage behandlat med ensileringsmedel hade lägre fruktos- och total WSC-halt efter lagring i 3 månader jämfört med kontrollerna. Det kan bero på att fler mjölksyrabakterier från det tillsatta ensileringsmedlet hade fermenterat mer WSC eftersom både halten bildad mjölksyra och ättiksyra var högre för foder behandlat med ensileringsmedel. Mer bildad mjölksyra och ättiksyra kan också ha bidragit till en bättre ensilering, lägre pH-värde och bevarande av näringsämnen då foder behandlat med ensileringsmedel gav högre halt råprotein och smältbart råprotein samt lägre halt av klostridiesporer (tabell 10).

Det fanns inga samspel mellan konserveringsmetod och ensileringsmedel för de olika WSC-fraktionerna. Det fanns inga samspel mellan lagringstid och ensileringsmedel för ensilage respektive hösilage. Det fanns ett samspel mellan kontroll och ensileringsmedel i fruktoshalten för både ensilage ($P= 0,003$) och hösilage ($P= 0,015$).

Osmotoleranta mjölksyrabakterier som ensileringsmedel kan vara användbart för att reducera fruktoshalten och totala WSC i ensilage och hösilage. Speciellt för hösilage där fermentationen är begränsad av brist på vatten kan det vara intressant med denna typ av tillsatsmedel. Däremot är det tveksamt om det kan ses som en effektiv metod att reducera WSC i vallfoder då det bara var fruktoshalten och därmed också den totala WSC-halten som minskade i detta försök. Det finns dock potential att utveckla ensileringsmedel med mjölksyrabakterier som reducerar WSC i ensilage. Det krävs mer forskning på detta område om vilka bakteriestammar och vilka kombinationer och koncentrationer av bakterier som är effektiva i att reducera WSC. Den mesta forskningen är fokuserad mot att försöka öka och bevara WSC-innehållet för att tillgodose högproducerande mjölkkors behov.

Tabell 10. Effekt av ensileringsmedel med avseende på näringsinnehåll och fermentationsprodukter (g/kg ts), mikrobiologisk sammansättning (log CFU/g) och halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) i ensilage och hösilage lagrat i 3 månader i jämförelse med kontroll (ingen behandling med ensileringsmedel)

Variabel	Kontroll	Ensileringsmedel	SEM	P
Torrsubstans g/kg	505	504	6,4	0,85
pH	5,59	4,62	0,061	<0,0001
Aska	74	76	1,6	0,29
Råprotein	117	127	2,0	0,01
Smältbart råprotein	79	88	1,9	0,008
Neutral detergent fiber	579	572	5,2	0,36
Energi (MJ ME/ kg ts)	10,1	10,2	0,06	0,059
Ammoniaktal	3,0	2,6	0,34	0,45
Mjölksyra	11,6	40,1	2,09	<0,0001
Ättiksyra	1,9	3,9	0,32	0,002
Propionsyra	1,4	0,4	0,36	0,09
Etanol	6,7	5,6	0,89	0,42
Myrsyra	0,9	0,5	0,07	0,002
Jäst	2,8	2,3	0,25	0,15
Mögel	1,8	1,7	0,04	0,35
Enterobakterier	1,1	0,7	0,23	0,26
Mjölksyrabakterier	6,5	6,6	0,14	0,63
Klostridiesporer	2,1	1,7	0,10	0,02
Glukos	33,9	29,4	1,65	0,09
Fruktos	16,2	10,0	0,83	0,0007
Sukros	1,8	0,8	0,48	0,17
Fruktaner	0,5	1,5	0,44	0,16
Lättlösliga kolhydrater	52,3	41,6	1,99	0,005

Effekt av blötläggning

Blötläggning i 24 timmar var effektivast för att reducera totala WSC-halten, jämfört med 12 timmars blötläggning, då alla fodertyper inkluderades i den statistiska analysen (tabell 11). Den största procentuella minskningen av total WSC-halt, efter blötläggning av foder, uppnåddes i ensilage som blötlagts i 24 timmar (tabell 12). I blötlagt hösilage reducerades mängden WSC totalt sett efter både 12 och 24 timmar men sukroshalten ökade dock efter 12 timmar (tabell 13). Blötläggning av hö gav ingen minskning av WSC utan resulterade istället i en ökning av halten fruktos, sukros och totala WSC efter 12 timmars blötläggning (tabell 14). Detta skulle kunna bero på att sukros hydrolyserats av glukosidaser, som finns i bakterier vilket skulle öka mängden glukos och fruktos (Berg *et al.*, 2002). Men då skulle sukroshalten ha minskat pga. hydrolysen och glukos- och fruktoshalten ökat vilket det inte gjorde. Denna ökning av fruktos och sukros skulle kunna bero på ett fel som uppstått i analysens beräkningssteg då man räknar fram innehållet med formeln enligt Larsson och Bengtsson (1983). Det fanns inget samspel mellan behandling med mjölksyrabakterier och blötläggning av ensilage och hösilage för WSC-halten (tabell 15-16). Skillnad mellan kontroll och ensileringsmedel fanns för WSC-halten i ensilage (tabell 15) respektive hösilage (tabell 16) före blötläggning, efter 3 månaders lagring, då ensileringsmedel gav lägre WSC-halt än kontroll.

Efter 24 timmars blötläggning hade antalet jäst, enterobakterier och mjölksyrabakterier ökat i alla fodertyper, medan antalet CFU för mögel hade minskat (tabell 11). I ensilage ökade jästantalet från före blötläggning till efter 24 timmars blötläggning. Antalet enterobakterier påverkades både av behandling med ensileringsmedel och av blötläggningstid; ensilage med ensileringsmedel innehöll lägst antal enterobakterier. Antalet mjölksyrabakterier i kontrollensilage ökade efter blötläggning men var oförändrat för behandlat ensilage (tabell 15). Antalet jäst och enterobakterier i hösilage ökade efter blötläggning (tabell 16). I hö ökade antalet mjölksyrabakterier efter blötläggning (tabell 17).

Blötläggning av hö har i tidigare försök påvisats resultera i stora variationer i minskning av WSC-innehållet. Därför bör det inte ses som ett säkert alternativ för att reducera WSC-innehållet i vallfoder. Longland *et al.* (2009) ansåg att reduktion av WSC genom blötläggning inte var en bra strategi för alla hötyper, och att vätskan som erhöles efter blötläggning kan bli ett miljöproblem då den innehöll höga halter av både WSC och råprotein.

I detta försök användes 17 liter vatten till 1 kg ts foder. Förhållandet av prov och vatten, 1:17, i detta försök är relativt lik de tidigare studier där förhållandet varit 1:12 (Longland *et al.*, 2009) och 1:20 (Warr & Petch, 1992). Försöket där förhållandet av prov och vatten var 1:80 (Watts, 2003) skiljer sig markant från de övriga. Om foderbehovet för en häst är t.ex. 10 kg ts foder/dag, skulle det åtgå 170 liter/dag, för att blötlägga allt foder om förutsättningarna för vattenvolymen är desamma som i detta försök. Det är inte hållbart med hänsyn till miljön och hantering av fodret vid blötläggning. Eftersom blötläggningssvetskan kan innehålla mycket urlakade näringsämnen skulle vätskan behöva tas om hand och inte hällas ut i avlopp eller rent av direkt på marken. Exempelvis kan en stor tank eller flytgödselbrunn användas för att lagra vätskan och sedan kan näringsämnena återföras tillbaka till marken. Frågan är dock hur stor del av näringen som återstår när blötläggningssvetskan lagrats.

Blötläggningssvetskans temperatur i detta försök varierade mellan prover (tabell 4) vilket kan ha påverkat mängden WSC och vilka fraktioner av WSC som lakades ur fodret. Det råder delade meningar kring fruktanernas löslighet i vatten då McDonald *et al.* (2002) hävdar att

alla fruktaner är lösliga i kallt vatten medan Watts (2003) påstår att bara de kortkedjiga fruktanerna är lösliga i kallt vatten och långkedjiga fruktaner är lösliga i varmt vatten. Ingen nämner dock vattnets temperatur. Jag anser att temperaturskillnaderna i detta försök inte har särskilt stor betydelse eftersom vattentemperaturen för alla foder jämnades ut efter 12 och 24 timmars blötläggning till ca. 13-14 °C.

Det behövs mer forskning för att jämföra olika vattenvolymer och blötläggningstider och dess effekt på WSC-halten i ensilage, hösilage och hö eftersom den mesta forskningen har varit fokuserad på att blötlägga hö. Det är dock tveksamt om blötläggning av foder är den rätta vägen för att reducera WSC med tanke på de faktorer som nämnts ovan.

Tabell 11. Effekt av blötläggning i 12 och 24 timmar för alla fodertyper lagrade i 3 månader på torrsubstanshalten (g/kg), halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) och mikrobiologisk sammansättning (log CFU/g)

Variabel	Före blötläggning	Efter 12 timmars blötläggning	Efter 24 timmars blötläggning	SEM	P
Torrsubstans	617 ^a	177 ^b	202 ^c	3,79	<0,0001
Glukos	25,7 ^a	12,7 ^b	10,3 ^b	0,88	<0,0001
Fruktos	11,1 ^a	8,9 ^b	8,0 ^b	0,51	0,0004
Sukros	1,1 ^a	2,4 ^b	0,8 ^a	0,42	0,03
Fruktaner	1,3 ^a	0,1 ^b	0,3 ^b	0,18	0,0001
Lättlösliga kolhydrater	39,3 ^a	24,1 ^b	19,5 ^c	1,2	<0,0001
Jäst	3,1	.	4,4	0,26	0,002
Mögel	2,9	.	2,6	0,08	0,008
Enterobakterier	2,4	.	3,3	0,29	0,04
Mjölksyrabakterier	5,4	.	6,0	0,17	0,007
Klostridiesporer	1,8	.	1,8	0,09	0,84

Tabell 12. Procentuell minskning av halten lättlösliga kolhydrater i ensilage blötlagt i 12 och 24 timmar

Variabel	Före blötläggning	Efter 12 h blötläggning	Efter 24 h blötläggning
Glukos	100	68	75
Fruktos	100	50	56
Sukros	100	46	42
Fruktaner	100	Nd	90
Lättlösliga kolhydrater	100	64	70

Tabell 13. Procentuell minskning och ökning av halten lättlösliga kolhydrater i hösilage blötlagt i 12 och 24 timmar

Variabel	Före blötläggning	Efter 12 h blötläggning	Efter 24 h blötläggning
Glukos	100	58	61
Fruktos	100	55	55
Sukros	100	126	11
Fruktaner	100	94	63
Lättlösliga kolhydrater	100	56	59

Tabell 14. Procentuell minskning och ökning av halten lättlösliga kolhydrater i hö blötlagt i 12 och 24 timmar

Variabel	Före blötläggning	Efter 12 h blötläggning	Efter 24 h blötläggning
Glukos	100	15	45
Fruktos	100	145	130
Sukros	100	229	21
Fruktaner	100	53	67
Lättlösliga kolhydrater	100	115	19

Tabell 15. Effekt av blötläggning i 12 och 24 timmar för ensilage behandlat med och utan ensileringsmedel, lagrat i 3 månader, på torrsubstanshalten (g/kg), halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) och mikrobiologisk sammansättning (log CFU/g)

Variabel	Före blötläggning		Efter 12 timmars blötläggning		Efter 24 timmars blötläggning		SEM		P	
	Kontroll	Ensileringsmedel	Kontroll	Ensileringsmedel	Kontroll	Ensileringsmedel	Behandling	Blötläggning	Interaktion	
Torrsubstans g/kg	406 ^{a, A}	391 ^{a, A}	171 ^{b, B}	172 ^{b, B}	189 ^{b, c, C}	197 ^{c, C}	7,20	0,74	<0,0001	0,30
Glukos	31,4 ^{a, A}	25,3 ^{c, A}	9,7 ^{b, B}	8,3 ^{b, B}	4,9 ^{b, B}	9,4 ^{b, B}	1,61	0,46	<0,0001	0,02
Fruktos	12,0 ^{a, A}	5,3 ^{b, A}	5,6 ^{b, B}	3,1 ^{b, B}	4,3 ^{b, B}	3,3 ^{b, B}	0,92	0,0007	0,0003	0,02
Sukros	1,9	0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	0,38	0,20	0,34	0,11
Fruktaner	Nd	1,0 ^a	Nd	Nd	0,1 ^b	0,1 ^b	0,22	0,12	0,07	0,03
Lättlösliga kolhydrater	45,2 ^{a, A}	32,0 ^{c, A}	15,8 ^{b, B}	11,9 ^{b, B}	10,0 ^{b, B}	13,5 ^{b, B}	2,48	0,046	<0,0001	0,02
Jäst	2,9	1,8	.	.	5,8	4,0	0,72	0,08	0,008	0,63
Mögel	1,8	1,7	.	.	1,7	1,7	0,05	0,35	0,35	0,357
Enterobakterier	1,5	0,7	.	.	3,9	0,7	0,48	0,003	0,04	0,04
Mjölksyrabakterier	6,9 ^a	6,8 ^a	.	.	9,3 ^b	6,5 ^b	0,20	<0,0001	0,0008	0,0001
Klostridiesporer	2,2	1,7	.	.	2,1	1,7	0,23	0,09	0,95	0,95

^{a, b, c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad för interaktioner mellan behandling och blötläggning vid det angivna P-värdet.

^{A, B, C} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet.

Nd= Icke detekterbar

Punkt innebär att variabeln inte är analyserad.

Tabell 16. Effekt av blötläggning i 12 och 24 timmar för hösilage lagrat i 3 månader på torrsubstanshalten, halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) och mikrobiologisk sammansättning (log CFU/g)

Variabel	Före blötläggning		Efter 12 timmars blötläggning		Efter 24 timmars blötläggning		SEM		P	
	Kontroll	Ensileringsmedel	Kontroll	Ensileringsmedel	Kontroll	Ensileringsmedel	Behandling	Blötläggning	Interaktion	
Torrsubstans g/kg	604 ^A	616 ^A	183 ^B	175 ^B	219 ^C	211 ^C	7,9	0,81	<0,0001	0,38
Glukos	36,3 ^A	33,4 ^A	13,2 ^B	16,3 ^B	13,2 ^B	13,8 ^B	1,7	0,86	<0,0001	0,26
Fruktos	20,3 ^{a, A}	14,7 ^{c, A}	7,5 ^{b, B}	8,2 ^{b, B}	8,9 ^{b, B}	6,7 ^{b, B}	0,95	0,01	<0,0001	0,26
Sukros	1,7	1,0	1,5	1,9	1,7	0,1	0,57	0,20	0,38	0,24
Fruktaner	1,2 ^A	2,0 ^A	0,1 ^B	Nd	Nd	0,6 ^B	0,49	0,28	0,015	0,53
Lättlösliga kolhydrater	59,4 ^{a, A}	51,2 ^{c, A}	22,3 ^{b, B}	26,3 ^{b, B}	23,7 ^{b, B}	21,2 ^{b, B}	2,0	0,20	<0,0001	0,03
Jäst	2,8	2,7	.	.	4,4	4,2	0,29	0,58	0,0006	0,74
Mögel	1,7	1,7	.	.	1,7	1,9	0,10	0,35	0,35	0,35
Enterobakterier	0,7	0,7	.	.	4,5	2,9	0,69	0,29	0,002	0,29
Mjölksyrabakterier	6,1	6,4	.	.	7,6	6,3	0,40	0,28	0,112	0,08
Klosridiesporer	2,1	1,7	.	.	1,8	1,9	0,13	0,36	0,81	0,13

^{a, b, c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnader för interaktioner mellan behandling och blötläggning vid det angivna P-värdet.

^{A, B, C} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnader vid det angivna P-värdet.

Nd= Icke detekterbar

Punkt innebär att variabeln inte är analyserad.

Tabell 17. Effekt av blötläggning i 12 och 24 timmar av hö lagrat i 3 månader på innehållet av lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) och mikrobiell sammansättning (log CFU/g)

Variabel	Före blötläggning	Efter 12 h blötläggning	Efter 24 h blötläggning	SEM	P
Torrsubstans g/kg	843	182	199	6,5	<0,0001
Glukos	16,3	13,8	9,0	2,04	0,11
Fruktos	10,3	14,9	13,4	1,25	0,1
Sukros	1,4	4,6	1,1	1,70	0,33
Fruktaner	1,5	0,7	0,5	0,37	0,19
Lättlösliga kolhydrater	29,5	34,0	24,0	2,80	0,11
Jäst	4,6	.	4,5	0,29	0,94
Mögel	5,3	.	4,2	0,34	0,08
Enterobakterier	5,6	.	5,0	0,41	0,39
Mjölksyrabakterier	2,9	.	4,3	0,24	0,01
Klostridiesporer	1,7	.	1,7	0,00	-

Punkt innebär att värdet inte är analyserat.

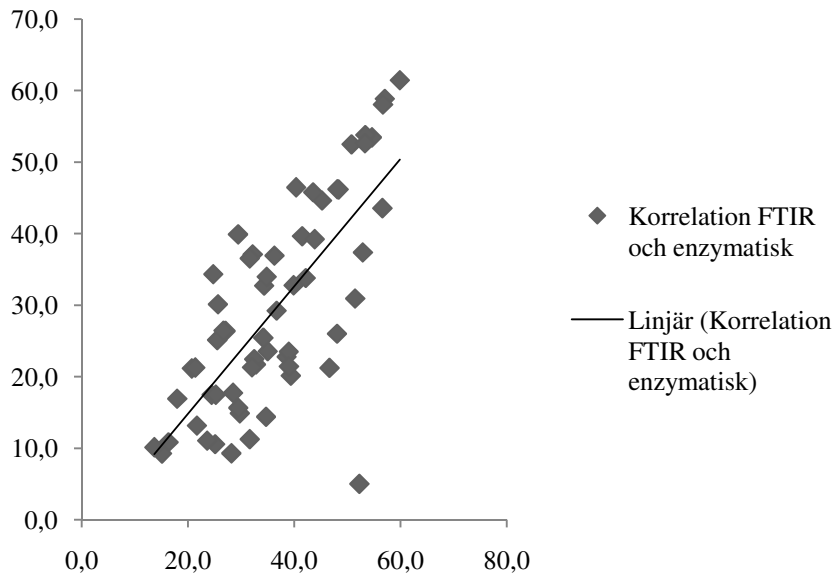
Jämförelse av analysmetoder för lösliga kolhydrater

Fourier transformerad infraröd spektroskopi och enzymatisk- spektrofotometrisk metod visade olika resultat med avseende på den totala halten WSC analyserad för alla foder oavsett lagringstid, behandling med ensileringsmedel och blötläggning (tabell 18-19). FTIR-analysen gav högre värden för WSC-halt än enzymatisk- spektrofotometrisk analysen vid samtliga jämförelser. Skillnaden mellan analysmetoder gällde både då WSC-innehållet räknades fram genom att använda ts-halt före blötläggning och ts-halt efter blötläggning för blötlagda prover. Eftersom det fanns skillnad mellan analysmetoderna när alla fodertyperna inkluderades jämfördes också om det fanns skillnad mellan analysmetoderna inom lagringstider (3 månader respektive 6 månader) (tabell 20) och inom blötläggningstider (12 timmar respektive 24 timmar) (tabell 21). Analysmetoderna gav olika resultat för det blötlagda fodret generellt, men inte för de olika lagringstiderna. Skillnaden mellan analysmetoderna för blötlagda foder kan bero på att i uträkningen från gram per liter till gram per kg ts användes ts-halt efter blötläggning som bestämdes genom förtorkning vilket ger en osäkrare ts-halt. De blötlagda proverna kan ha innehållit olika mängd blötläggningssväska innan ts-bestämningen eftersom de absorberat olika mycket vatten beroende på andel stjälpkar och blad i fodret. Ytterligare en bidragande orsak kan vara då pressvattenproverna preparerades, blötlagt foder vägdes upp innan spädningen med vatten, kan blötläggningssväska som fanns kvar på provet ha påverkat spädningen i pressvattnet. Därmed kan koncentrationen av WSC ha varierat. När WSC beräknades fram genom ts-halt före blötläggning gav det dock också skillnad mellan analysmetoder. Eftersom FTIR genomgående gav högre värden än enzymatisk- spektrofotometrisk analys skulle det kunna innebära att den analyserar andra substanser i spektrat som inte detekteras i den andra analysmetoden. Det kan i sin tur innebära att FTIR är mer exakt än enzymatisk-spektrofotometrisk metod. Skillnaderna mellan de två analysmetoderna är dock inte så stora, praktiskt sett. FTIR gav 1,5% WSC jämfört med den enzymatiska 1,2% WSC (tabell 18). Frågan är hur viktig exaktheten är då man vill veta WSC-halten i sitt vallfoder. Det är svårt att få ett representativt prov för det vallfoder man har då man oftast tar bara ett prov från flera ton vallfoder. WSC-halten kan ju variera inom just det partiet med hö eller inom varje bal av ensilage eller hösilage.

Vid jämförelse av analysmetod för WSC-halten i alla fodertyper lagrade i 3 månader respektive 6 månader fanns dock ingen skillnad mellan analysmetod (tabell 20). Detta ger en antydning om att analysmetoderna är jämställda med varandra men att det krävs fler studier där man jämför FTIR spektroskopi och enzymatisk-spektrofotometrisk analys av WSC i flera olika vallfodertyper för att få större säkerhet.

Jag tycker att analysföretag och forskare bör enas om en mer standardiserad analysmetod för att mäta WSC-halten i vallfoder eftersom det finns så många olika sätt. Det är också viktigt att analys av WSC i vallfoder blir mer lättillgängligt, snabbt och kostnadseffektivt för hästägare och vallfoderproducenter.

Korrelation mellan FTIR och enzymatisk analys, WSC g/kg ts



Figur 4. Korrelation mellan FTIR och enzymatisk analys för samtliga prover analyserade med avseende på den totala WSC-halten

Tabell 18. Jämförelse av FTIR- och enzymatisk-spektrofotometrisk analys med avseende på den totala halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) för alla fodertyper oavsett lagringstid, behandling eller blötläggning. WSC beräknad med ts-halt efter blötläggning

Variabel	FTIR	Enzymatisk-spektrofotometrisk	SEM	P
Lättlösliga kolhydrater	30,2	23,3	1,57	0,0001

Tabell 19. Jämförelse av FTIR- och enzymatisk-spektrofotometrisk analys med avseende på den totala halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) för alla fodertyper oavsett lagringstid, behandling eller blötläggning. WSC beräknad med ts-halt före blötläggning

Variabel	FTIR	Enzymatisk-spektrofotometrisk	SEM	P
Lättlösliga kolhydrater	14,5	11,9	1,20	0,05

Tabell 20. Jämförelse av FTIR- och enzymatisk-spektrofotometrisk analys med avseende på den totala halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) för alla fodertyper lagrade i 3 månader respektive 6 månader

Variabel	FTIR		Enzymatisk		SEM		P	
	3 månader	6 månader	3 månader	6 månader	3 månader	6 månader	3 månader	6 månader
Lättlösliga kolhydrater	39,8	34,2	39,2	31,6	1,41	2,55	0,752	0,44

Tabell 21. Jämförelse av FTIR- och enzymatisk-spektrofotometrisk analys med avseende på den totala halten lättlösliga kolhydrater (g/kg ts) för alla fodertyper blötlagda i 12 timmar respektive 24 timmar

Variabel	FTIR		Enzymatisk		SEM		P	
	12 timmar	24 timmar	12 timmar	24 timmar	12 timmar	24 timmar	12 timmar	24 timmar
Lättlösliga kolhydrater	57,9	45,9	34,8	30,7	3,25	1,78	<0,0001	<0,0001

Potentiella metoder för reduktion av lättlösliga kolhydrater i vallfoder

Jag anser att det behövs mer forskning kring vilka nivåer av WSC som passar olika typer av hästar; överviktiga, hästar med fång, insulinresistens osv. för att veta hur mycket WSC-halten bör minskas innan utfodring och vilken halt som bör eftersträvas vid skörd, konservering och lagring av vallfoder. Dessutom behöver det klargöras vilken/vilka WSC- fraktioner, dvs. glukos, fruktos, sukros och fruktaner, som är viktig/viktiga att minska till en häst med fång, IR eller EMS. Detta behöver man veta både ur utfodringssynpunkt och ur foderproduktionssynpunkt.

Frågan är om det enbart är mängden WSC i vallfodret som spelar roll vid utfodring av hästar med sjukdomar relaterade till överutfodring till WSC. Utfodringsfrekvensen, alltså hur ofta hästen utfodras och hur lång ättid fodret ger bör också tas hänsyn till då man vet att glukosnivåerna stiger efter utfodring (Frape, 2004). Det bör då vara lämpligare att ge fri tillgång av vallfoder för att jämna ut glukosnivåerna eftersom hästar föredrar att äta ca 18 h per dygn. Om det inte är möjligt att ge hästen fri tillgång, t.ex. för att fodret innehåller för mycket WSC, kan andra metoder såsom att utfodra vallfoder i finmaskigt hönät komma att betyda mer för hästens välbefinnande i väntan på den optimala metoden för att reducera WSC. Det bör därför undersökas vilka metoder som lämpar sig bäst för utfodring med fri tillgång av vallfoder till dessa hästar utan att de överutfodras med WSC.

Jag tror att det finns potential att utveckla ensileringsmedel med bakterier som förbrukar WSC under konserveringen av ensilage och hösilage. Det behövs särskilt mer forskning kring ensileringsmedel eller andra metoder för reduktion av WSC för hösilage eftersom det är ett vanligt förekommande grovfoder till hästar.

Det skulle vara intressant att jämföra fler ts-halter i vallfoder vid konservering, främst för ensilage som verkar ha större potential än hösilage att bli ett foder med lägre WSC. Detta skulle man kunna göra i kombination med att undersöka effekten av olika ensileringsmedel. Det bör också undersökas huruvida smakligheten i det färdiga fodret blir då man försökt minska WSC genom att utfodra en grupp hästar.

SLUTSATSER

Möjligheter att påverka innehållet av lättlösliga kolhydrater i vallfoder

Hösilage hade det högsta innehållet av totala lättlösliga kolhydrater (WSC) efter 3 och 6 månaders lagring jämfört med ensilage och hö. Lagringstiden hade effekt på WSC-halten i hö då lagring i 6 månader gav lägre halt jämfört med 3 månaders lagring. Det fanns ingen effekt av lagringstid för ensilage på halten lättlösliga kolhydrater. Hösilage hade högst innehåll av WSC och fruktos jämfört med ensilage och hö då effekten av konserveringsmetod jämfördes, och lägst WSC-halt återfanns då i ensilage och hö. Ensilage och hösilage behandlat med mjölksyrabakterier som ensileringsmedel hade lägre halt WSC än obehandlat foder. Blötläggning hade ingen reducerande effekt på innehållet av WSC i hö utan ökade istället halten fruktos, sukros och totala WSC efter 12 timmars blötläggning. Blötläggning i 24 timmar var dock effektivast för att reducera WSC jämfört med 12 timmars blötläggning då ensilage hade den största minskningen.

Jämförelse av analysmetoder för lättlösliga kolhydrater

Det fanns en skillnad mellan värden analyserade med FTIR- spektroskopi och enzymatisk-spektrofotometrisk analys i WSC-halt när alla fodertyper inkluderades i jämförelsen. FTIR-spektroskopi gav högre analysvärden än enzymatisk -spektrofotometrisk analys. Analysmetoderna gav dock likvärdiga resultat för WSC i foder lagrat i 3 respektive 6 månader. Det behövs fler studier där WSC i olika typer av vallfoder analyseras med FTIR för att den ska bli en pålitlig analysmetod som kan ersätta eller komplettera enzymatisk-spektrofotometrisk metod.

ACKNOWLEDGEMENTS

Jag vill först och främst tacka min handledare Cecilia Müller för att jag fick möjligheten att genomföra detta examensarbete. Tack för att du bjudit på din expertis och hjälpsamhet. Speciellt tack för att du tålmodigt introducerade mig till statistikprogrammet och bearbetning av statistisk data.

Tack Peter Udén för uträkningar av FTIR- analyserade värden av WSC.

Tack till personalen på Kungsängens forskningscentrum, speciellt till Börje Ericson och Håkan Wallin för ert trevliga bemötande och er hjälp med analyser och uträkningar.

Till min käraste, Alexander för att du har stöttat mig hela vägen genom agronomutbildningen, utan dig hade det inte varit möjligt.

ABSTRACT

The purpose with this study was to find practical methods to reduce the concentration of glucose, fructose, sucrose and fructans, constituting the water soluble carbohydrates (WSC), in forage. A lower concentration of WSC in forage for horses could be useful if the horse suffer from laminitis caused by overfeeding of WSC; insulin resistance, equine metabolic syndrome or Equine Cushing's syndrome. Factors that could influence the concentration of WSC in the conserved forage are the maturity of the grass at harvest, conservation method, storage time, use of additives and soaking of forage before feeding.

Another purpose was to evaluate Fourier transformed infrared (FTIR) spectrophotometric analysis of WSC in forage and compare this method with the enzymatic- spectrophotometric analysis used by convention. FTIR- analysis is normally used for analyzing milk but it could be an alternative to enzymatic-spectrophotometric analysis of WSC in forage. The advantage with FTIR is that it's fast and a relatively cheap method and it could replace or complement the present analysis.

The effects of storage time, conservation method, use of additive with lactic acid producing bacteria and soaking of forages on the WSC-content in silage, haylage and hay were investigated. The forage was harvested in the middle of June 2010. The forage crop was conserved as silage (40 % dry matter, DM) and haylage (60% DM) in laboratory silos with and without osmotolerant lactic acid bacteria as additive, and as hay (85 % DM) in small bales. Samples were collected after 3 months of storage and analyzed for chemical and microbial composition and WSC-fractions. Silage, haylage and hay stored for 3 months were soaked in tap water for 12 and 24 hours. Samples taken after each soaking time were analyzed for WSC-fractions and microbial composition (only after 24 hours). When the forage had been stored for 6 months they were sampled again, but only analyzed for WSC and no soaking was performed.

Hay and silage had the lowest content of WSC compared with haylage that had the highest value after three months of storage. Hay had the lowest content of WSC after six months of storage. Storage time had no effect on WSC-content for silage and haylage. Total WSC-content and fructose content in silage and haylage was lower for forage that had been conserved with additive compared with controls. Soaking of hay increased the fructose and sucrose content after 12 hours of soaking, but soaking silage for 24 hours resulted in the greatest reduction of WSC-content of all forages.

There was a difference between analyzed values of WSC-content between FTIR analysis and enzymatic-spectrophotometric analysis when including all forages in the comparison. There was also a difference between methods when comparing values from soaked forages. FTIR analyzed values were higher than enzymatic –spectrophotometric analysis in all comparisons except for the WSC-values from forages stored for 3 or 6 months which were equal.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Al Jassim, R. A. M., 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* 248, 75–81.
- Archibald, J. G., Bart, J., Blaisdell, M. L., Spelman, A. F. 1951. Quality in roughages. I. factors which influence hay composition and quality. *Journal of Dairy Science* 34, 656-668.
- Asplin, K. E., Sillence, M. N., Pollitt, C.C., McGowan, C.M. 2007. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *The Veterinary Journal* 174, 530-535.
- Asplin, K. E., Curlewis, J. D., McGowan, C. M., Pollit, C. C., Sillence, M. N. 2011. Glucose transport in the equine hoof. *Equine veterinary journal* 43, 196-201.
- Bailey, S. R., Baillon, M. L., Rycroft, A. N., Harris, P. A., Elliott, J. 2003. Identification of equine cecal bacteria producing amines in an in vitro model of carbohydrate overload. *Applied and environmental microbiology* 69, 2087-2093.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. 2002. *Biochemistry*. 5th edition. W. H. Freeman and Company. New York. Pp. 33, 302, 527-548.
- Butler, G.W., Bailey, R.W. 1973. *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Academic Press. London. Vol 1. pp, 106, 110, 137-139, 141, 143-144, 151.
- Chai, W.H., Udén, P. 1998. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal feed science and technology*, 74, 281-288.
- Conaghan, P., O’Kiely, P., O’Mara, F.P. 2010. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. *J. Dairy Sci.* 93, 628–643.
- Cottrell, E., Watts, K., Ralston, S. 2005. Soluble sugar content and glucose/insulin responses can be reduced by soaking chopped hay in water. *Proceedings of the Equine Science Society* 19, 293-298.
- DeLaval. Hemsida. [online] (2011) Tillgänglig: http://www.delaval.se/NR/rdonlyres/011D8A7D-F033-44F2-A1E6-0FE5422E3A2A/0/660L_SilageF3000.pdf [2011-03-23]
- Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H., Van Wikselaar, P. G. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science* 56, 330-343.

- Elliott, J., Bailey, S. R. 2006. Gastrointestinal derived factors are potential triggers for the development of acute equine laminitis. *The journal of nutrition. The WALTHAM international nutritional sciences symposia*. pp. 2103-2107.
- van Eps, A.W., Pollitt, C.C. 2006. Equine laminitis induced with oligofructose. *Equine Veterinary Journal* 38, 203-208.
- Frank, N. 2009. Equine Metabolic syndrome. *Journal of Equine Veterinary Science* 29, 259-267.
- Frape, D. 2004. *Equine nutrition & feeding*. 3rd edition. Blackwell publishing Ltd. Oxford. UK. pp, 32-35, 38, 46-47, 392, 452.
- Frape, D. 2010. *Equine nutrition & feeding*. 4th edition. Blackwell publishing Ltd. Oxford. UK. pp, 317, 319.
- Grenager, N . 2010. How does Cushing's disease relate to laminitis? Advances in diagnosis and treatment. *Journal of equine veterinary science* 30, 482-490.
- Henneke, D. R. 1985. A condition score system for horses. *Equine Practice* 7, 13-15.
- Hoffman, R. M., Wilson, J. A., Kronfeld, D. S., Cooper, W. L., Lawrence, L. A., Sklan, D., Harris, P. A. 2001. Hydrolyzable carbohydrates in pasture, hay, and horse feeds: direct assay and seasonal variation. *Journal of Animal Science* 79, 500–506.
- Hoffman, R.M. Boston, R.C. Stefanovski, D. Kronfeld, D.S., Harris, P.A. 2003. Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. *Journal of Animal Science* 81, 2333-2342.
- Larsson, K., Bengtsson, S. 1983. Bestämning av lättillgängliga kolhydrater i växtmaterial. Metodbeskrivning nr 22. *Statens lantbrukskemiska laboratorium (SLL)* 22. Uppsala.
- Lindgren, E. 1983. Nykalibrering av VOS-metoden för bestämning av energivärde hos vallfoder. Institutionen för husdjurens utfodring och vård. Stencil. Sveriges Lantbruksuniversitet. Uppsala.
- Longland, A.C., Barfoot, C., Harris, P.A. 2009. The loss of water-soluble carbohydrates and soluble protein from nine different hays soaked in water for up to 16 hours. *Journal of Equine Veterinary Science* 29, 383-384.
- Longland, A.C., Harris, P.A. 2009. The ethanol-soluble carbohydrate content and composition of some common horse feeds. *Journal of Equine Veterinary Science* 29, 396-397.
- Mackenzie, D. J., Wylam, C. B. 1957. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. VIII - Changes in carbohydrate composition during growth of perennial ryegrass. *Journal of Science Food and Agricultural* 8, 38-45.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A. 2002. *Animal Nutrition*. 6th edition. Pearson Education Limited. Harlow. Essex, UK. pp. 26-28, 182, 497, 507, 516, 524, 537-539.

- McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S. J. E. 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2nd edition. Chalcombe Publications. Marlow, Bucks. pp. 11-12, 22-23, 30, 25, 50, 58.
- Merry, R.J., Winters, A.L., Thomas, P.I., Müller, M., Müller, T. 1995. Degradation of fructans by epiphytic and inoculated lactic acid bacteria and by plant enzymes during ensilage of normal and sterile hybrid ryegrass. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 583-591.
- Neuman, L. 2002. Teknik för vallskörd i ekologiskt lantbruk. Jordbruksinformation 3- 2002. Jordbruksverket.
[\[http://www.sjv.se/download/18.1b8099a110e3ab7cbd80003999/Tekn.+f%C3%B6r+vall+ekol+labr.pdf\]](http://www.sjv.se/download/18.1b8099a110e3ab7cbd80003999/Tekn.+f%C3%B6r+vall+ekol+labr.pdf) 2010-07-19
- NRC (National Research Council). 2007. *Nutrient requirements of horses*. Sixth revised edition. The national academies press. Pp. 34, 237.
- Pålson, T. 1973. Bestämning av råproteinets smältbarhet i vallfoder. Stencil. Institutionen för husdjurens utfodring och vård. SLU, Uppsala.
- Shewmaker, G.E., Mayland, H.F., Roberts, C.A., Harrison, P.A., Chatterton, N.J., Sleper, D.A. 2006. Daily carbohydrate accumulation in eight tall fescue cultivars. *Grass and Forage Science* 61, 413-421.
- Sjaastad, Ö.V., Hove, K., Sand, O. 2003. *Physiology of domestic animals*. Scandinavian Veterinary Press, Oslo. Pp. 33, 228-231, 549
- Spörndly, R. 2003. Fodertabeller för idisslare. Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala. Rapport 257. p. 78.
- Turner, L. R., Donaghy, D. J., Lane, P. A., Rawnsley, R. P. 2007. Distribution of water-soluble carbohydrate reserves in the stubble of prairie grass and orchardgrass plants. *Agronomy Journal* 99, 591-594.
- Udén, P. 2009. Estimating residual starch from *in vitro* fermentations by Fourier transform mid-IR transmission spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology* 152, 133–140.
- Udén, P., Sjaunja, L.-O. 2009. Estimating volatile fatty acid concentrations in rumen samples by Fourier transform mid-IR transmission spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology* 152, 123–132.
- Udén, P. 2010. The influence of sample preparation of forage crops and silages on recovery of soluble and non-structural carbohydrates and their predictions by Fourier transform mid IR transmission spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology* 160, 49-61.
- Warr, E. M., Petch, J. L. 1992. Effects of soaking hay on its nutritional quality. *Equine Veterinary Education* 5, 169-171.
- Watts, K. A., Chatterton, J.N. 2004. A review of factors affecting carbohydrate levels in forage. *Journal of Equine Veterinary Science*. 84-86.

Watts, K. A. 2004. Forage and pasture management for laminitic horses. *Clinical techniques in equine practice* 3, 88-95.

Watts, K. A. 2003. Soaking Hay to Remove Excess Soluble Carbohydrate and Potassium. Rocky Mountain Research & Consulting, Center, CO <http://www.safergrass.org/>

Wylam, C. B. 1953. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. III. – Carbohydrate breakdown during wilting and ensilage. *Journal of Science Food and Agricultural* 4, 527-531.