



Proteinkvalitet och biogena aminer i ensilage – effekt på mjölkors hälsa & foderintag

*Protein quality & biogenic amines in silage – effect on health
& feed intake of dairy cows*

Malin Hamberg

Skara 2013

Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Studentarbete
Sveriges lantbruksuniversitet
Institutionen för husdjurens miljö och hälsa

Nr. 499

Student report
Swedish University of Agricultural Sciences
Department of Animal Environment and Health

No. 499

ISSN 1652-280X



Proteinkvalitet och biogena aminer i ensilage – effekt på mjölk- kors hälsa & foderintag

*Protein quality & biogenic amines in silage – effect on health &
feed intake of dairy cows*

Malin Hamberg

Studentarbete 499, Skara 2013

**Husdjursvetenskap - Husdjur, examensarbete för kandidatexamen, Grund, G2E, 15
hp, kurskod: EX0553**

Handledare: Elisabet Nadeau, SLU, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa, Box
234, 532 23 SKARA

Examinator: Katarina Arvidsson, SLU, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa, Box
234, 532 23 SKARA

Nyckelord: Ensilage, proteinkvalitet, biogena aminer, foderintag, djurhälsa, mjölkkor
Key words: Silage, protein quality, biogenic amines, feed intake, animal health, dairy cow

Serie: Studentarbete/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens miljö och
hälsa, nr. 499, ISSN 1652-280X

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för husdjurens miljö och hälsa

Box 234, 532 23 SKARA

E-post: hmh@slu.se, **Hemsida:** www.slu.se/husdjurmiljohalsa

I denna serie publiceras olika typer av studentarbeten, bl.a. examensarbeten, vanligtvis omfattande 7,5-30 hp. Studentarbeten ingår som en obligatorisk del i olika program och syftar till att under handledning ge den studerande träning i att självständigt och på ett vetenskapligt sätt lösa en uppgift. Arbetenas innehåll, resultat och slutsatser bör således bedömas mot denna bakgrund.

Abstract

The aim of this paper was to explain protein degradation in silage and protein quality and biogenic amines in silage and their effects on the health of the dairy cows. After harvesting, the plant proteases degrade the proteins in the plant. The protein degrades to different fractions with different digestibilities in the rumen. Fraction A contains non-protein nitrogen which is peptides, free amino acids and amines. True protein is in the fraction B and is further divided into three subfractions depending on their solubility. Fraction C is insoluble and bound to the lignin-cellulose complex. Biogenic amines are found naturally in forages but can also be formed by microorganisms. Proteolytic clostridia and enterobacteria can decarboxylate free amino acids to biogenic amines. By using additives in silage making the pH is decreased rapidly and the protein degradation is decreased. In silage with less than 50 % true protein of crude protein different symptoms have been observed when it is feed to dairy cows. Symptoms are, for example, high somatic cell count in milk, displaced abomasum and fertility problems. Studies have shown that biogenic amines are accountable for decreased feed intake, ketonemi and impaired immune function in ruminants. Decreased feed intake can impair the negative energy balance after parturition, which can impair the immune defense and health problems. The conclusion of the paper was that it is worth reducing the protein degradation in silage, because the studies have shown that it influences the health of dairy cows. More studies are needed to understand the silage protein quality and the effect of biogenic amines on feed intake and health.

Sammanfattning

Syftet med litteraturstudien var att undersöka proteinnedbrytning i ensilage och proteinkvalitet samt innehåll av biogena aminer i ensilage och deras effekt på mjölkors hälsa. Efter skörd bryter växtens proteaser ner växtprotein. Proteinet bryts ner till olika fraktioner med olika smältbarhet i vommen. Fraktion A består av icke-proteinkväve som består av peptider, fria aminosyror och aminer. Fraktion B som är sant protein och delas beroende på löslighet ytterligare in i tre underfraktioner. Fraktion C är olösligt och bundet till lignin-cellulosakomplexet. Biogena aminer finns naturligt i växten innan ensilering, men kan även bildas under ensilering av mikroorganismer. Proteolytiska klostridier och enterobakterier kan dekarboxylera fria aminosyror till biogena aminer. Genom att använda tillsatsmedel vid ensilering sänks pH snabbare och minskar proteinnedbrytningen. I ensilage med mindre än 50 % sant protein av råprotein har olika hälsoproblem observerats vid utfodring till mjölkor. Exempel på symptom är höga celltal i mjölken, löpmagsförskjutning och fertilitetsproblem. Studier har visat att biogena aminer ger minskat foderintag, ketonemi och försämrad immunfunktion hos idisslare. Minskat foderintag kan försämra den negativa energibalansen efter kalvning vilket kan ge försämrat immunförsvar och hälsoproblem. Slutsats av arbetet var att det är värt att minska proteinnedbrytningen i ensilage, då studier visar att det påverkar mjölkors hälsa och foderintag. Fler studier behövs för att förstå ensilagens proteinkvalitet och innehåll av biogena aminer inverkan på foderintag och hälsa.

Introduktion

Grovfoder som ensilage är en del av mjölkors foderstat och är viktig för foderstatens fysiska struktur. Enligt svenska rekommendationer ska minst 40 % och helst mer av totala torrsubstansintaget (TS-intag) vara grovfoder. Ensilage innehåller både energi och protein för djuren (Spörndly, 2003). I vommen bryts fodret ner till de flyktiga fettsyror (VFA), butyrat, propionat och acetat, och används som energi (Sjaastad et al. 2010c).

Proteinets kvalitet i grovfoder avgörs av proteinnedbrytningen (proteolys) i grödan efter skörd, vid förtorkning och ensilering. Proteinet bryts ner till icke-proteinkväve (NPN)

såsom peptider, fria aminosyror och ammoniak (Muck et al., 1996). Genom sänkning av pH-värdet under ensilering går proteolysreaktionen långsammare och mindre del av proteinet bryts ner (McDonald et al., 2011). Tillsatsmedel vid ensilering ger snabbare pH-sänkning och kan då minska proteinnedbrytningen (Slottner & Bertilsson, 2006). Ensilage med mindre än 50 % av råprotein (RP) som sant protein har visat sig ge högre incidens av höga celltal i mjölken, fertilitetstörning och digestionsstörning (Höltershinken et al., 2011; Theermann et al., 2011; Wichern et al., 2011). Celltal i mjölk är ett mått på juverhälsa och visar hur många kroppsegna celler som finns i mjölken (Svensk Mjolk, 2013).

Biogena aminer är enkla kväveföreningar som bildas främst genom dekarboxylering av aminosyror (Van Os et al., 1996a), vilket vissa mikroorganismer såsom proteolytiska klostridier, enterobakterier och vissa arter eller stammar av mjölksyrabakterier utför (Ohsima & McDonald, 1978; Joosten, 1987). De återfinns i ensilage i betydande mängd (Macpherson & Violante 1966; Tviet et al., 1992) och har blivit relaterade till foderintagsdepression hos mjölkkor (Clancy et al., 1977). Biogena aminer är toxiska agenter som kan ge hälsoproblem vid intag av stora mängder (Joosten, 1988), tabell 1 visar rekommenderade gränserna i grovfoder (Richardt, 2012).

Tabell 1: Gränser för biogena aminer i grovfoder (Richardt, 2012)

Innehåll	Kommentarer
<5 g/kg TS	Innehållet av biogena aminer har inte ökat efter skörd
5-15 g/kg TS	Innehållet av biogena aminer har ökat och degradering av aminosyror sker. Djurhälsa, foderintag och mjölmängd kan påverkas
>15 g/kg TS	Innehållet har ökat kraftigt och hög degradering av aminosyror. Förväntad påverkan på djurhälsa, foderintag och mjölmängd. Ska inte utfodras.

Syftet med den här litteraturstudien är att beskriva proteinnedbrytningen under ensilering och att studera effekt av proteinkvalité i ensilage på mjölkors hälsa. Arbetet ska innehålla eventuella samband mellan mängden biogena aminer i ensilage och hälsa, med fokus på fertilitet, juverhälsa och immunförsvar.

Ensilering

Det som är viktigt för att göra bra ensilage är att snabbt skapa en anaerob miljö där mjölksyraproduktionen minskar pH-värdet (Kung, 2000). Mjölksyrabakterier fermenterar vattenlösliga kolhydrater till organiska syror, främst mjölksyra som sänker pH. Även ättiksyra och propionsyra bildas. Genom pH-sänkningen inhiberas tillväxten av oönskade bakterier såsom klostridier och enterobakterier (McDonald et al., 2011). Vid ökning av torrsubstansen minskar antalet mjölksyrabakterier och fermenteringen avtar samtidigt som klostridieaktiviteten i ensilaget avtar om det förtorkas till en torrsubstanshalt över 30-35 % (Kung, 2000). Tillsatsmedel kan hjälpa fermenteringen under ensilering och även förbättra aeroba stabiliteten i ensilaget under utfodringsfasen (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

Oönskade mikroorganismer i ensilage

Ensilagets proteiner kan brytas ner av proteolytiska enterobakterier och klostridier (McDonald et al., 2011). Enterobakterier tillhör den epifytiska floran på grödan och är fakultativ anaerob (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Klostridier är strikt anaeroba och sporbildande mikroorganismer som kan producera toxiner. Exempel på proteolytiska klostrider är *Clostridium sporogenes* och enterobakterier är *Escherichia coli*. Klostrider kräver ett pH på minst 5 men kan även växa långsamt till pH ner till 4,5 (Driehuis, 2013) och de flesta enterobakterier får minskad levnadskraft vid pH under 4,5- 5 (Heron et al., 1993), men om

syre är tillgängligt förlängs överlevnaden (Donald, et al., 1995). Under den första delen av fermenteringen under ensileringen konkurrerar enterobakterier med mjölksyrabakterier om näring, men vid sänkt pH inhiberas enterobakteriernas aktivitet (Van Os et al., 1997).

Proteolys efter skörd

Vid skörd sker en snabb proteolys i grödan då växtenzymmer bryter ner det sanna aminosyraproteinet (McDonald et al., 2011). Ensilage med lågt innehåll av vattenlösliga kolhydrater har ofta hög proteinhalt och proteinet kan relativt lätt brytas ner till enkla kväveföreningar av mikroorganismer i ensilaget (Davies et al., 1998). Proteolysreaktionen kräver vatten vilket gör att ensilage med hög torrsubstanshalt har lägre nedbrytning av protein. Lågt pH gör att proteinnedbrytning går långsammare (Slottnér & Bertilsson, 2006). Proteolysreaktionen fortsätter fram till att syre har förbrukats, men sänkning av pH inaktiverar växtens proteaser (Kung, 2000). Det mesta av proteolysreaktionen sker under ensilering (Edmunds et al., 2012).

Biogena aminer i ensilage

Biogena aminer bildas genom dekarboxylering av vissa aminosyror i foder och smält foder under fermentering (Phuntsok et al., 1998) även om det finns naturligt i gräs innan ensilering (Van Os et al., 1996a). Mikroorganismer som kan dekarboxylera aminosyror till biogena aminer och ammoniak har specifika aminosyra-dekarboxylaser (Van Os et al., 1996a). Exempel på mikroorganismer är enterobakterier (Joosten, 1987) och proteolytiska klostridrier (Ohsima & McDonald, 1978). Enterobakter har svag proteolytisk verkan som kan dekarboxylera aminosyror vilket bidrar till bildandet av ammoniak och biogena aminer vilket ger minskad smaklighet och foderintag hos idisslare (Van Os et al., 1997). I tabell 2 finns de vanligaste förekommande biogena aminerna och deras ursprungliga aminosyror. Under de första dagarna av fermenteringen bildas de flesta biogena aminer. Ammoniak och ättiksyra är positivt relaterad till innehållet av biogena aminer i ensilage och signifikant korrelation finns mellan ammoniakkväve och innehåll av biogena aminer (Van Os et al., 1996a). Tillsatsmedel vid ensilering minskar koncentration av biogena aminer kraftigt (Steidlová & Kalac, 2004).

I ensilage med lågt och stabilt pH ökar inte koncentrationen av biogena aminer under ensilering (Hughes, 1970). Faktorn som begränsar biogena aminers innehåll i ensilage är högt TS som har en lägre vattenaktivitet, vilket begränsar aktiviteten hos växtens proteolytiska enzymer (Kemble & Macpherson, 1954). Det går inte att kombinera hög TS-halt med lågt pH i ensilage eftersom halten av vattenlösligt socker sjunker vid högre TS. Med mindre socker i grödan minskar mängden mjölksyra vilket gör att pH inte kan sänkas lika lågt som i ensilage med låg TS-halt (McDonald et al., 2011). I ensilage med låg TS-halt fortsätter tyramin och histamin att bildas under lagring (Van Os et al., 1996a).

Tabell 2: Vanligaste biogena aminer i ensilage och deras ursprungs aminosyror (McDonald et al., 2011; Ritchardt, 2012)

Aminosyror	Biogena aminer
Arginin	Putrescin
Glutaminsyra	Gamma-aminosmörnsyra (GABA)
Histidin	Histamin
Lysin	Kadaverin
Tyrosin	Tyramin

Kväveföreningar i ensilage

Råproteinet (RP) består av olika proteinfraktioner (Licitra et al., 1996). Fraktion A innehåller icke-proteinkväve (NPN), fraktion B innehåller sant lösligt protein och fraktion C som är otillgängligt protein. B-fraktionen delas upp i tre fraktioner (B₁, B₂ och B₃) beroende av deras löslighet och nedbrytning i vommen. Lösligt kvävebeståndsdelar bryts ner snabbt i vommen. Fraktion C kan vanligtvis inte utnyttjas av djuren och är bundet till acid detergent fiber (ADF) och benämns ADF-kväve (Licitra et al., 1996). Lösligt protein i ensilage är fraktion A och B₁, som är den första indikatorn på graden av proteolys. Fraktion B₂ & B₃ bidrar med olika grad till vomstabil protein (Richardt, 2012).

Indelning i de olika fraktionerna bestäms utifrån analyserade värden av sant protein. Sant protein analyseras sedan som olösligt, protein som är bundet till neutral detergent fiber (NDF) och protein som är bundet till ADF. Differensen mellan värdena ger de olika proteinfractionerna (Richardt, 2012). Fraktion A bestäms utifrån skillnaden mellan totala råproteinkvävet och värdet på utlöst sant proteinkväve (Licitra et al., 1996). Vid analys används ofta lösningsmedel som innehåller triklorättiksyra eller volframsyra. Syrorna bryter ner olika storlekar av peptider. Lösligt kväve och protein, fraktion A och B, är definierade som sant protein som är lösligt i buffert vid vom-pH. NPN ingår inte utan subtraheras genom att tillsätta volframsyra och endast lösligt protein och kväve är kvar. Acid detergent olösligt kväve (fraktion C) förefaller att vara resistent, osmältbar och associerade med lignin. För att analysera fraktionen används syra detergent lösning och aceton som lösningsmedel som löser upp de andra fraktionerna och ADF-kväve är kvar. Kväve som associeras med NDF är också inkluderar osmältbar kväve i acid detergent fällning. Proteinet är osmältbar i neutral detergent lösning men lösligt i acid detergent men degraderas långsamt och benämns fraktion B₃ (Licitra et al., 1996).

Ökad torrsubstans ger en ökning av vomstabil protein och en minskning av NPN. Vid en snabbare förtorkning av grönmassan avbryts proteolysen tidigare (Edmunds et al., 2012). Ökad torrsubstanshalt genom effektiv förtorkning under bra väderleksförhållanden minskar koncentrationen av NPN (Hirstov & Sandev, 1998).

Ensilerings effekt på proteinkvaliteten

Under ensilering ändras proteinfraktionerna B₁ och B₃ till NPN (Edmunds et al., 2012), proteinet går från vomstabil till vomlösligt. Ett överskott av vomlösligt protein i fodergiv-an kräver extra energi för att bilda mikrobprotein (Aiello et al., 1987). Förtorkning och tillsatsmedel minskar halten ammoniakkväve i ensilaget jämfört med direktskörd och inget tillsatsmedel. Ammoniakkväve består av ammoniak och ammoniumjoner (Hirstov & Sandev, 1998).

En bra indikator på hur mycket protein som brutits ner under ensilering är ammoniakhalten (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

Under normal förtorkning i ca ett dygn ökar mängden av svårnedbrytbart protein, det vomstabila proteinet som inte bryts ner i vommen (Nadeau et al., 2012b). Vomstabil protein ökade med 11 % vid användning av kemiskt och biologiskt tillsatsmedel jämfört med kontroll. Ökningen beror till stor del av att mängden NPN minskar och neutral detergent lösligt protein (NDSP; fraktion B₂) ökar jämfört med ensilage som inte behandlats med tillsatsmedel. Råproteinhalten i ensilaget skilde sig inte mellan ensilagebehandlingar. Det

kemiska tillsatsmedlet innehöll natriumnitrit hexamin, natriumbensoat och sorbat och biologiska tillsatsmedlet innehöll homofermentativa mjölksyrabakterier (Nadeau et al., 2012b).

Tillsatsmedel i ensilage sänker pH genom att de antingen innehåller mjölksyrabakterier (biologisk), organiska syror eller kemiska föreningar (kemisk) (Slottnér & Bertilsson, 2006). Vid inokulering med mjölksyrabakterier sänks pH i ensilaget fortare än syrabehandlat och obehandlat ensilage (Davies et al., 1998). Inokulering med mjölksyrabakterier ger en signifikant högre mjölksyrakoncentration och lägre pH samt lägre koncentrationer av ättiksyra och ammoniakkväve än obehandlat ensilage (Driehuis et al., 1996). Ett bra fermenterat ensilage kan göras med eller utan tillsatser. Bra ensileringssteknik kan inte ersättas med tillsatsmedel (Driehuis & Oude Elferink, 2000).

Nishino et al. (2007) undersökte mjölksyrabakterierna *Lactobacillus casei* och två stammar av *L. buchneri* för deras produktion av biogena aminer och effekt på biogena aminer. Gräsensilage och majsensilage inokulerades med *L. casei* och *L. buchneri* som jämfördes med obehandlat ensilage som kontroll. Koncentrationen av biogena aminer i gräsensilaget minskade vid inokulering av *L. buchneri*. Inokulering av *L. casei* minskade innehållet av biogena aminer förutom kadaverin och histamin. Behandling med *L. buchneri* minskade histamin och tyramin. Putrescin och kadaverin i ensilaget inokulerad med *L. buchneri* var liknande i koncentration som i obehandlat ensilage (Nishino et al., 2007).

Biogena aminers effekt på foderintag

De vanliga biogena aminer i ensilage som minskar smakligheten är histamin, tyramin och putrescin (Dulphy & Van Os, 1996). Phuntsok et al. (1998) undersökte biogena aminer i lusernensilage och deras verkan på stutar i avseende på foderintag och digestionsfunktioner. Koncentrationer av de biogena aminerna putrescin, kadaverin, tryptamin och histamin undersöktes med olika fodergivor av lucernensilage, 0-33 % av totala TS-intaget. I vommen sker extensiv nedbrytning av biogena aminer, men koncentrationen i löpmagen var relaterad till foderinnehållet. Koncentrationer av putrescin och kadaverin var negativt korrelerade med TS-intaget. Vommens rörelse, fodrets smältbarhet i vommen, TS-intaget samt utflödet från vommen minskade linjärt med ökad mängd lucernensilage. Biogena aminer var tillgängliga för absorption och relaterade till depression av foderintag (Phuntsok et al., 1998).

I en studie injicerades putrescin, smörsyra och valerinsyra samt vatten som kontroll i vommen hos mjölkkor (Lingaas & Tveit, 1992). Vissa av mjölkkorna, som fick 100 g putrescin injicerat, fick anorexia. Grovfoderintaget var lägre än de andra grupperna än grupperna under försöksperioden. De som fick putrescin hade signifikant lägre foderkonsumtion vid kvällsfodring under försöket än de andra behandlingarna (Lingaas & Tveit, 1992).

Mjölkkor som utfodrades med ensilage där histamin, tyramin, putrescin och kadaverin tillsattes visade ingen effekt på det dagliga foderintaget eller beteende (Van Os et al., 1995a). Mängden biogena aminer i ensilage som tillsats var 4,3 g/kg TS. Däremot minskade foderintaget vid utfodring av kontrollensilage, vilket förklarades med de höga mängderna av fermenteringsprodukter i kontrollensilaget. Vid utfodring med ensilage med tillsatta biogena aminer höjdes pH signifikant i vommen (Van Os et al., 1995a).

Försök med stutar där tyramin, GABA och putrescin tillsattes i vommen genom kanyl visade ingen signifikant effekt på foderintaget (Dawson & Mayne, 1996). Vomvätskans in-

nehåll analyserades också i försöket. Tillsats av 6 g/kg TS tyramin ökade pH signifikant i vomvätskan och äthastigheten 30 minuter efter fodring. Effekten på äthastighet kan bero på att tyramin ökade intaget men djuret anpassades till behandlingen och effekten avtog. Även tillsats av 4 g/kg TS GABA ökade foderintaget 30 minuter efter fodring signifikant. Tillsats av putrescin gav signifikant reduktion av kvävenedbrytbarheten i vommen. Slutsatsen av studien var att biogena aminer & GABA kan ha en begränsad roll i kontroll av frivilligt foderintag av gräsensilage i vuxna idisslare (Dawson & Mayne, 1996).

Får utfodrades med ensilage som antingen behandlats med myrsyra, myrsyra med tillsatta aminer eller myrsyra med tillsatta aminer (putrescin, tyramin, histamin och kadaverin) eller biogena aminer, ammoniak och GABA (Van Os et al., 1996b). Koncentrationerna av biogena aminer och GABA som tillsattes till ättiksyrabehandlad ensilage i de två försöken ses i tabell 3.

Tabell 3: Koncentration av biogena aminer och GABA i ensilage under de två olika försöken (Van Os et al., 1996b)

Koncentration biogena aminer	Koncentration biogena aminer och GABA	Biogena aminer
1,1g/kg TS	0,6g/kg TS	Kadaverin
0,8 g/kg TS	0,5g/kg TS	Histamin
1,2 g/kg TS	0,7 g/kg TS	Putrescin
1,8 g/kg TS	1 g/kg TS	Tyramin
-	5 g/kg TS	GABA

Ammoniakkoncentration i vommen ökade efter måltid i alla behandlingar utan olika signifikanta skillnader emellan behandlingarna. I ensilaget var koncentrationen av biogena aminer och kväveinnehållande produkter liknande koncentrationer som hittas i dåligt fermenterat ensilage. Foderintaget minskade inte, men en ringa negativ effekt förekom på ensilagens smaklighet (Van Os et al., 1996b).

Proteinkvalitetens effekt på djurhälsa

I Tyskland har foderrelaterade symptom observerats som beror på låg andel sant protein av RP och kallas "factorial disease of dairy herds" (Theermann et al., 2011; Wichern et al., 2011). Symptomen för sjukdomen är: höga celltal i mjölken, fertilitetsstörningar, digestionskanalsproblem, löpmagsförskjutning, downer cow syndrome och plötsliga dödsfall (Theermann et al., 2011). Sjukdomen verkar vara kopplad till fodret då symptomen i besättningen försvinner när ensilagens byts till ett med högre andel sant protein av RP (Höltershinken et al., 2011).

I en studie av Wichern et al. (2011) var syftet att undersöka skillnader i vominnehållet efter fermentering av gräsensilage som innehöll mindre andel sant protein än 50 % av RP (Wichern et al., 2011). De använde in vitro-systemet RUSITEC (RUmen SIMulation TECneique), ett system som efterliknar vommens fermentering, innehållande mikroorganismer och vomvätska (Czerkawski & Breckenridge, 1977). Ensilage med låg andel sant protein och kontroll ensilage fermenterades under 28 dagar med en tillvänjningsperiod på nio dagar. Sex försök per ensilage utfördes. Resultat av försöken var att sex substanser upptäcktes varav fyra ökade vid fermentering av låg andel sant protein i ensilaget. Substanserna kunde inte identifieras och antas ha bildats av mikroberna i RUSITEC (Wichern et al., 2011). Fermentering av ensilage med lågt innehåll (<50% av RP-innehåll) av sant protein i in vitro-systemet RUSITEC visade att produktionen av grenade flyktiga fettsyror

(BCVFA) (Höltershinken et al., 2011). In vitro-systemet användes på liknade sätt som Wichern et al. (2011), men resultatet analyserades med gas-kromatografi. BCVFA används av vommikroberna för att syntesera aminosyror för mikrobprotein (Sjaastad et al., 2010b). Studien visar att aminosyrametabolismen påverkas av ensilage med ett lågt innehåll av sant protein (Höltershinken et al., 2011), vommikrobernas får mer substrat att syntesera protein.

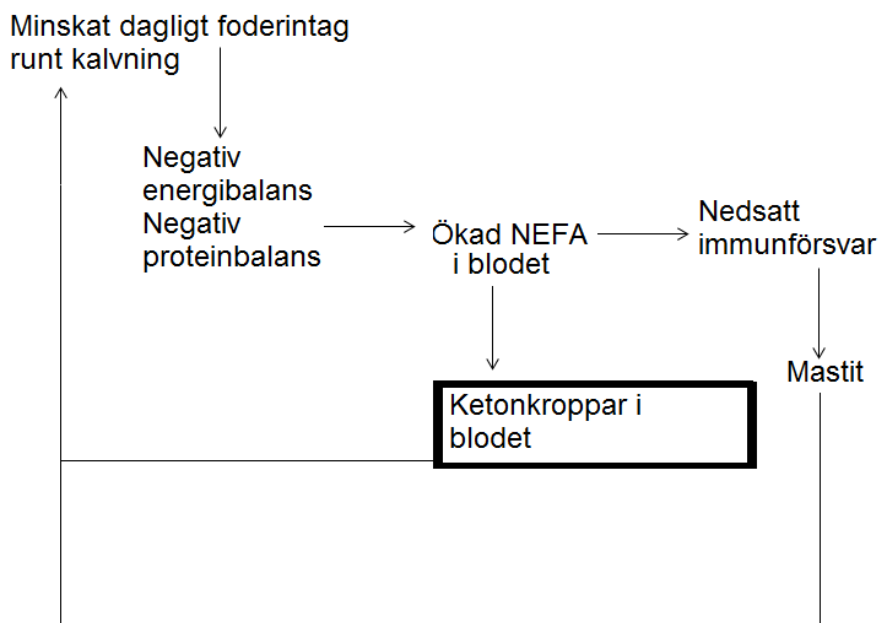
Nadeau et al. (2012a) beskrev en signifikant minskning av celltalet i mjölken för kor som utfodrades med ensilage som behandlats med ett kemiskt tillsatsmedel innehållande natriumnitrit hexamin, natriumbensoat och sorbat. Hexamin omvandlas till formaldehyd vilket sänker pH i ensilage. (Slottnér & Bertilsson, 2006). Biologiskt tillsatsmedel innehållande mjölksyrabakterier visade en tendens till lägre celltal (Nadeau et al., 2012a).

Biogena aminers effekt på djurhälsa

Biogena aminer har viktiga funktioner i kroppen och har en farmakologisk effekt. De kan bildas både av mikroorganismer i ensilage men även av felfermentering i vommen exempelvis under acidosis (Aschenbach & Gäbel, 2000). Idisslare får aminer från både foder och vommikrobkälla och därför har de en potential att absorberas i större mängder hos idisslare än hos andra djurslag (Phuntsok et al., 1998).

Biogena aminer har olika negativa hälsoeffekter i hela djuret (Richardt, 2012). Vasoaktiv effekt av biogena aminer (speciellt tyramin) ger störning av blodflöde i de små kapillärerna, främst i benen vilket kan göra kon halt. Slemhinnorna i magsäcken, tunntarmen och könsorganen skadas av biogena aminer. Histamin ger nedsättning av immunfunktionen (Richardt, 2012). Histamin stimulerar också ökat blodflöde och ger allergibesvär såsom inflammation i slemhinnor (Sjaastad et al., 2010b).

Biogena aminer, speciellt putrescin, är associerade med ketonemi (mätbara ketonkroppar i blodet; Lingaas & Tviet, 1992). Negativ energibalans (NEB) har beskrivits vara ett problem hos högproducerande kor efter kalvning (Suriyasathaporn et al., 2000). Det finns flera faktorer som är tecken på NEB såsom kroppsvikt, icke esterifierade fettsyror (NEFA) i blodet samt fett-proteinkvoten i mjölk och ketonkroppar i blodet (Heurer et al., 1999). Under NEB används kroppsreserver, vilket leder till potentiell ökning av ketonkroppar i blodet (Suriyasathaporn et al., 2000). Höga koncentrationer av ketonkroppar reducerar foderintaget och minskar mobiliseringen av fettsyror, vilket förvärrar energibristen (Herdt et al., 1988). NEFA i blodet kan försämra immunförsvaret (Goff, 2006). Figur 1 visar foderintagets påverkan på djurhälsan.



Figur 1: Foderintagets eventuella påverkan på djurhälsan (modifierad från Goff, 2006).

Ensilage med ett sant protein innehåll på mindre än 50 % av RP hade effekt på biogena aminen GABA i vommen (Theermann et al., 2011). Metoden var den samma som Wichern et al. (2011) använde, men vätskan i RUSITEC analyserades. Resultatet av studien var att fermentering av ensilage med lågt innehåll av sant protein gav ett signifikant högre innehåll av GABA än ensilage med högt innehåll av sant protein (Theermann et al 2011). GABA kan ge hälsoproblem och fertilitetsstörningar (Richardt, 2012).

Diskussion

I gräs är biogena aminer naturligt förekommande, vilket gör att ensilage även innehåller biogena aminer. Förutom det som naturligt finns i gräs kan vissa bakterier bilda biogena aminer. Detta görs genom att proteinet bryts ner och de fria aminosyror dekarboxyleras till biogena aminer (McDonald et al., 2011). Med det minskade proteininnehållet i ensilaget gör att kon måste äta mer för att få i sig samma proteinmängd. Biprodukterna från proteinnedbrytningen så som ammoniak och biogena aminer minskar smakligheten av fodret. Minskad smaklighet gör att det även är svårt att få i kon de rekommenderade 40 % av den totala torrsubstansen (Spörndly, 2003), vilket även kan påverka texturen i vommen och mikroorganismers förutsättningar att fermentera fodret. Den minskade smakligheten gör att det kan vara svårt för kon att äta den mängden ensilage som behövs för att tillfredsställa proteinbehovet utan att öka mängden koncentrat. Ett minskat foderintag kan bidra till att kon efter kalvning är kvar längre i NEB än vad hon skulle med normalt foderintag. En längre period med NEB kan påverka immunförsvaret och fertiliteten (Goff, 2006). Försvagad kroppsresurs efter NEB kan även bidra till att kon är känsligare för sjukdomar (Suriyasathaporn et al., 2000). Även om studier inte har visat negativa fysiologiska effekter av biogena aminer på mer än foderintag, kan minskat foderintag försämra hälsan då det blir brist på näring.

Mjölproduktionen störs av "factorial disease of dairy herds", så som höga celltal och fertilitetsstörning och beror troligen på lågt innehåll av sant protein av råprotein innehåll (Theermann et al., 2011). Proteininnehållet i ensilaget är det som påverkar symptomen och gra-

den av nedbrytning av växtens protein. Sänkning av pH minskar även produktionen av biogena aminer då ett lägre antal fria aminosyror finns för mikroorganismer att dekarboxylera. Det kan alltså vara ekonomiskt försvarbart att se till att minskningen av proteinnedbrytningen i ensilaget blir så liten som möjligt. Ensilage med lågt innehåll av sant protein har en högre mängd GABA än ensilage med högre sant protein innehåll. Utfodring med sådant ensilage ger en ökning av GABA i vommen (Theermann et al., 2011). Tillsats av GABA i vommen hos stutar gav ingen signifikant skillnad i foderintag eller substanser i vommen (Dawson & Mayne, 1996). Van Os et al. (1996b) använde både GABA och aminerna kadaverin, histamin, putrescin och tyramin som tillsats i ensilage, som utfodrades till får. Inga direkta effekter på foderintag fanns, men ensilagens smaklighet försämrades. Fermentering av ensilage med låg andel sant protein i in vitro systemet RUSITEC visade en ökning av BCVFA (Höltershinken et al., 2011) som främst används av mikroorganismerna i vommen för aminosyrasyntes (Sjaastad et al., 2010b). Eftersom alla mikroorganismer i vommen kan utnyttja BCVFA så kan fermenteringen i vommen påverkas, och vid en felaktig fermentering kan enligt Aschenbach & Gäbel (2000) biogena aminer bildas. Ökningen av GABA i vommen (Theermann et al., 2011) och oidentifierade substanser (Wichern et al., 2011) vid utfodring av liknande ensilage som Höktershinken et al. (2011), kan ge en bild till det som även händer inne i vommen vid utfodring av ensilage med låg sant protein.

För att minska koncentrationen biogena aminer kan antingen pH sänkas eller öka TS-halten (Kemble & Macpherson, 1954; Hughes, 1970). Det är dock inte möjligt att ha både lågt pH och högt TS, då ett lågt pH utan tillsatsmedel kräver högre mängd mjölksyrabakterier (McDonald et al., 2011). Strategi för att minska biogena aminer bör anpassas till de möjligheter som finns. Kan grödan förtorkas på fältet till önskvärd torrsubstans innan ensileringen utan regn kan det vara värt att satsa på högre TS-halt. Om detta inte är möjligt är det bra med lägre pH och acceptera lägre TS. Även om Van Os et al. (1996a) visade att mängden tyramin och histamin ökar under ensilering vid lägre TS-halt så kan fortfarande pH sänkas för att minska proteolysreaktionen. Att använda tillsatsmedel under ensilering har gett minskade koncentrationer av biogena aminer i ensilage (Steidlová & Kalac, 2004). Även inokulering av mjölksyrabakterier kan minska innehållet av tyramin och histamin i ensilage (Nishino et al., 2007). Man kan då även utan TS-halt och pH använda tillsatsmedel för att minska innehållet av biogena aminer i ensilaget. En annan positiv aspekt med att använda tillsatsmedel är resultatet från Nadeau et al. (2012a) där celltal i mjölken minskade signifikant vid användning av kemiskt tillsatsmedel i ensilaget. I den studien undersöktes inte innehållet av biogena aminer i ensilaget, vilket skulle kunna vara en förklaring till resultatet. Biogena aminer påverkar hälsan hos kon vilket kan bidra till andra sjukdomar. Richardt (2012) beskrev bl.a. att biogena aminer kan skada slemhinnor i magtarmkanalen och könsorganen vilket kan bidra till infektion, då bakterier kan ta sig in i blodet.

Phuntsok et al. (1998) såg en nedbrytning av biogena aminer i vommen, men att de fortfarande finns kvar i löpmagen och koncentrationen går att relatera till koncentrationen i fodret. I vommen skedde extensiv nedbrytning av aminer vilket gör att biogena aminer var möjliga att absorberas av djuren senare i digestionssystemet. Biogena aminer i ensilage ger en ändring av djurens beteende (Van Os et al., 1995a) och fermenteringen i vommen (Theermann et al. 2011) och har en dokumenterad effekt att påverka fysiologiska effekter (Lingaas & Tviet, 1992) såsom anorexia och ketonemi. Alla studier visar inte en effekt på beteende. Dawson och Mayne (1996) fick endast effekt direkt efter fodring, foderintaget ökade men studiens slutsats var att biogena aminer inte hade en stor roll i regleringen av foderintaget. Van Os et al. (1996b) visade ingen skillnad i dagligt foderintag, medan foder-

intaget minskade vid tillsats av biogena aminer enligt Lingaas & Tveit (1992), Dawson & Mayne (1996) och Phuntsok et al.(1998). Skillnaderna i effekten av biogena aminer är tydlig, men koncentration och metod har varierat i studierna. Resultaten kan därför både bero på mängd och tillvägagångssätt, vilket bör studeras vidare.

Det finns inte en enkel förklaring till varför vissa studier visar en effekt och vissa inte får effekt av biogena aminer. Studierna har gjorts med olika metodik, vissa valde att injicera direkt i vommen, andra tillsats i grovfoder eller utnyttja naturlig innehåll i ensilaget. Enligt Richardt (2012) så kommer troligtvis ensilage med högre än 15 g/kg TS ge effekt på djurhälsa, mjölk mängd och foderintag, lägre innehåll (5-15 g/kg TS) kan ge effekt. Dawson & Mayne (1996) fick resultat på foderintag och äthastighet med tillsats av 4 g/kg TS GABA och 6 g/kg TS tyramin i vommen. Van Os et al. (1996b) fick ingen signifikant effekt på foderintaget, men tillsatserna låg inom det rekommenderade för bra ensilage (Richardt, 2012). Minskingen i foderintaget i studien (Van Os et al., 1996) tros bero på det lägre smaklighet beroende på innehåll av biogena aminer och ammoniak. Individkillnad och eventuella miljöskillnader bidra till effekt på djurhälsan och foderintag av biogena aminer. Studier som använt stutar kan ge en felaktig bild av de eventuella effekter som biogena aminer har. Dawson & Mayne (1996) resonerade över deras försök att om man använder lakterande kor så kan resultatet bli annorlunda då de är känsligare för förändring i sin miljö. Även om studier med stutar inte visar några hälsoeffekter kan, i fall studien upprepades på lakterande kor, få ett annat resultat. Van Os et al. (1995a) använde mjölkkor som utfodrats med ensilage med tillsatta biogena aminer. Studien visade ingen effekt på foderintag, men pH i vommen höjdes signifikant.

Att använda tillsatsmedel under ensilering har gett minskade koncentrationer av biogena aminer i ensilage (Steidlová & Kalac, 2004). Proteinnedbrytningen minskas vid sänkt pH och högre torrsubstans (Slottnér & Bertilsson, 2006), vilket kan ge en framtida strategi att använda tillsatsmedel och högre torrsubstans i ensilage. Celltal i mjölken har visats minska signifikant vid utfodring av ensilage med kemisk tillsats (Nadeau et al., 2012a). Med de studierna kan ett framtida sätt vara att använda tillsatsmedel under ensilering för att både säkerhetsställa proteininnehållet i ensilage och djurhälsa.

Slutsats av arbetet är att det finns många effekter som ensilage som innehåller biogena aminer, kan ha vilka kan påverka hälsan hos mjölkkor. Även andra proteinetkvalitetsparametrar påverkar djurhälsan, vilket motiverar att använda bra ensileringsteknik och tillsatsmedel för att minska proteinnedbrytningen under ensilering. Studier som undersöker biogena aminers verkan i kroppen efter intag av ensilage behövs i framtiden för att förstå deras verkan i kroppen.

Referenser

- Aiello, R.J., Amentano, L.E., Gloconeogenesis in goat hepatocytes is affected by calcium, ammonia and other key metabolites but not primarily through cytosolic redox state. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 88, 193-201.
- Aschenbach, J.R., Gäbel, G., 2000. Effect and absorption of histamine in sheep rumen; significance of acidotic epithelia damage. *Journal of Animal Science* 78, 464-470.
- Clancy, M., Wangsness, P.J., Baumgardt, B.R. 1977. Effect of Silage Extract on Voluntary Intake, Rumen Fluid Constituents, and Rumen Motility. *Journal of Dairy Science* 60, 580-590.
- Czerkawski, J.W., Breckenridge, G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique. *British Journal of Nutrition* 38, 371-284.
- Davies, D.R., Merry, R.J., Williams, A.P., Bakewell, E.L., Leemans, D.K., Tweed, J.K.S., 1998. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. *J.Dairy Sci.* 81, 444-453.
- Dawson, L.E.R., Mayne, C.S. 1996. The effect of intraruminal infusions of amines and gamma amino butyric acid on rumen fermentation parameters and food intake of steers offered grass silage. *Animal Feed Science Technology* 63, 35-49.
- Donald, A.S., Fenol, D.R., Seddon, B. 1995. The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 141-148.
- Driehuis, F. 2013. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agriculture and Food Science* 22, 16-34.
- Driehuis, F. & Oude Elferink, S.J.W.H., 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *The veterinary quarterly* 22, 212 -217.
- Driehuis, F., van Wilkselaar, P.G., van Vuuren, A.M. & Spoelstra, S.F., 1996. Effect of bacterial inoculant on rate of fermentation and chemical composition of high dry matter grass silages. *Journal of Agriculture Science* 128, 323-329.
- Edmunds, B.L., Spiekers, H., Südekum, K.-H., Nussbaum, H., Schwarz, F. & Bennett, R., 2012. Optimising nitrogen use in dairy farming; Evaluation of ruminal crude protein degradation and protein value of forage. *Avhandling. Rheinische- Friedrich- Willhelm Universität Bonn.*
- Goff, J.P. 2006. Major Advances in Our Understanding of Nutritional Influences on Bovine Health. *Journal of Dairy Science* 89, 1292-1301.
- Hirstov, A.N. & Sandev, S.G., 1998. Proteolysis and rumen degradability of protein in alfalfa preserved as silage, wilted silage or hay. *Animal Feed Science and Technology* 72, 175-181.
- Herd, T.H., Wensing, T., Haagsman, H.P., Golde, L.M.G., Breukink, H.J. 1988. Hepatic triacylglycerol synthesis during a period of fatty liver development in sheep. *Journal of Animal Science* 66, 1997-2013.
- Heron S.J.E., Wilkinson, J.F., Duffus, C.M. 1993. Enterobacteria associated with grass and silages. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 13-17.

- Hughes, A.D. 1970. The non-protein nitrogen composition of grass silages. II. The changes occurring during the storage of silage. *Journal of Agriculture Science* 37, 421-431.
- Höltershinken, M., Lump, L., Wichern, A., Gresner, S., Theermann, S. & Bollwein, H., 2011. *In vitro* studies on the effects of grass silages containing < 50% of crude protein as true protein on carbohydrate metabolism in bovine ruminal fluid. In: 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Proceedings, 343.
- Kemble, A.R. & Macpherson, H.T. 1954. Liberation of Amino Acids in Perennial Rye Grass During Wilting. *Biochemical Journal* 58, 46-49.
- Kung, L., 2000. Silage fermentation & additives. Direct-fed microbial. Enzyme & forage additive Compendium. Miller Publishing Co., Minnetonka, MN.
- Joosten, H.M.L.J. 1987. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 3. Factors influencing the amounts formed. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 41, 329-257.
- Licitra, G., Hernandez, T.M., Van Soest, P.J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57, 347-358.
- Lingaas, F., Tveit, B. 1992. Etiology of Acetonemia in Norwegian Cattle 2. Effect of Butyric acid, Valeric Acid, and Putrescine. *J. Dairy Sci.* 75, 2433 – 2439.
- MacPherson, H.T. & Violante, P. 1966. Ornithine, putrescine and cadaverine in farm silage. *J. Sci. Food Agric.* 17, 124-127.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalg, J. F. D. and Morgan, C. A. 2002. Silage. *Animal Nutrition*. 7th edition. 499-502. Longman Scientific & Technical, Harlow Essex, UK.
- Muck, R.E., Mertens, D.R., Walgenbach, R.P., 1996. Proteolysis in different forage species, US Dairy Forage Research Center. Research Summaries.
- Nadeau, E., Johansson, B. Auerbach, H., 2012a. Ensilagens proteinkvalitet och dess inverkan på mjölkens konsumtion, avkastning och mjöksammansättning. Projekt nr 01006, Slutrapport till VL-stiftelsen
- Nadeau, E., Richardt, W., Murphy, M., Auerbach, H. 2012b. Protein quality dynamics during wilting and preservation of grass-legume forage. In: XVI International Silage Conference, 2-4 Juli, Finland, Proceedings, 56-57.
- Ohsima, M., McDonald, P. 1978. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29, 497-505.
- Phuntsok, T., Froetschel, A., Amos, H.E., Zeng M., Huang, Y.W. 1998. Biogenic amines in silage, apparent post-ruminal passage, and the relationship between biogenic amines and digestive function and intake by steers. *J. Dairy Sci.* 81, 2193-2203.
- Richardt, W., 2012. Silage quality and animal health. In: The future of silage preservation, 1st International silage summit. 43-66. Anytime Publishing Services.
- Slottner, D., Bertilsson, J. 2006. Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology* 127, 101-111.
- Sjaastad, O.V., Sand, O. & Hove, E. 2010a. Immunology. *Physiology of Domestic Animals*. 2nd edition. Oslo: Scandinavian Veterinary Press. 208, 349.

- Sjaastad, O.V., Sand, O. & Hove, E. 2010b. The digestive system. Physiology of Domestic Animals. 2nd edition. Oslo: Scandinavian Veterinary Press. 208, 570-573.
- Spörndly, R. 2003. Fodertabeller för idisslare 2003. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård. Rapport 257. 46-48, 50. SLU Publikationstjänst, 84.
- Steidlová, Š. & Kalac, Č. 2003. Biogenic Amines in Grass Silages. Archives of Animal Nutrition 58, 245-254.
- Suriyasathaporn, W., Heuer, C., Noordhuizen-Stassen, E.N., Schukken, Y.H. 2000. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. Veterinary Res. 31, 397-412.
- Svensk Mjölk. Mars 2013.
<http://www.svenskmjolk.se/Mjolkkgarden/Mjolkkvalitet/Celltal/#.UVVMuxxhXO4>
- Theermann, S., Gresner, N., Wichern, A., Bollwein, H., Höltershinken, M. 2011. Effects of grass silages with low true protein on γ -aminobutyric acid in bovine ruminal fluid *in vitro*. In: 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Proceedings, 298.
- Tviet, B., Lingaas, F., Svendsen & Sjaastad, Ø.V. 1992. Etiology of Acetonemia in Norwegian Cattle 1. Effect of Ketogenic Silage, Season, Energy Level, and Genetic Factors. J Dairy Sci. 75, 2421- 2432.
- Van Os, M., Dulphy, J.P., Baumont, R. 1995a. The influence of ammonia and amine on grass silage intake and intake behavior in dairy cows. Ann Zootech 44, 73-85.
- Van Os, M., Dulphy, J.P., Beumont, R. 1995c. The effect of protein degradation products in grass silages on feed intake and intake behavior in sheep. British Journal of Nutrition 73, 51-64.
- Van Os, M., Jailler, M., Dulphy, J.P. 1996b. The influence of ammonia, biogenic amines and gamma aminobutyric acid on grass silage intake in sheep. British Journal of Nutrition 76, 347-358.
- Van Os, M., Lassalas, B., Toillon, S., Jouany, J. 1995b. In vitro degradation of amines by rumen micro-organisms. Journal of Agriculture Science 125, 299-305.
- Van Os, M., Van Vuuren, A.M., Spoelsta, S.F. 1997. Mechanisms of adaptation in sheep to overcome silage intake depression induced by biogenic amines. British Journal of Nutrition 77, 399-415.
- Van Os, M., van Wilkselaar, P.G., Spoelstra, S.F. 1996a. Formation of biogenic amines in well fermented grass silages. Journal of Agriculture Sci. 127, 97-107.
- Wichern, A., Özmen, S., Theermann, S., Gresner, N., Bollwein, H. & Höltershinken, M., 2011. *In vitro* studies on the effects of grass silages containing <50% of crude protein as true protein on up to now not identified substances in bovine ruminal fluid. In: 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Proceedings, 342.

Vid **Institutionen för husdjurens miljö och hälsa** finns tre publikationsserier:

- * **Avhandlingar:** Här publiceras masters- och licentiatavhandlingar
- * **Rapporter:** Här publiceras olika typer av vetenskapliga rapporter från institutionen.
- * **Studentarbeten:** Här publiceras olika typer av studentarbeten, bl.a. examensarbeten, vanligtvis omfattande 7,5-30 hp. Studentarbeten ingår som en obligatorisk del i olika program och syftar till att under handledning ge den studerande träning i att självständigt och på ett vetenskapligt sätt lösa en uppgift. Arbetenas innehåll, resultat och slutsatser bör således bedömas mot denna bakgrund.

Vill du veta mer om institutionens publikationer kan du hitta det här:
www.slu.se/husdjurmiljohalsa

DISTRIBUTION:

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens miljö och hälsa
Box 234
532 23 Skara
Tel 0511-67000
E-post: hmh@slu.se
Hemsida:
www.slu.se/husdjurmiljohalsa

*Swedish University of Agricultural Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and Animal
Science
Department of Animal Environment and Health
P.O.B. 234
SE-532 23 Skara, Sweden
Phone: +46 (0)511 67000
E-mail: hmh@slu.se
Homepage:
www.slu.se/animalenvironmenthealth*
