



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020, 30 stp
Fakultet for biovitenskap

Effekt av grasensilering med forskjellige syrer, kjemiske stabilisatorer, lactobacillus spp. og eksogene fibrolytiske enzymer på aerob stabilitet, kjemisk sammensetning og *in vitro* vomnedbrytning.

Effects of grass ensiling with different acids, chemical stabilizers, lactobacillus spp. and exogenous fibrolytic enzymes on aerobic stability, chemical composition and *in vitro* rumen degradation.

Thea Brustad
Husdyrvitenskap

Forord

Denne oppgaven er siste del av et femårig studieløp innen husdyrvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Det har vært fem gode og lærerike år som jeg vil se tilbake på med et smil.

Jeg har hele livet vært veldig interessert i dyr, og alt som har med dyr å gjøre. På videregående startet jeg på naturbruk, og det var da interessen for husdyr virkelig slo til. Valget falt dermed for å starte på husdyrvitenskap, og det er et av de beste valgene jeg har tatt så langt i livet.

Det er jo selvfølgelig et par personer som fortjener en stor takk for all hjelp underveis. Først og fremst vil jeg takke hovedveileder Dr. Liv Torunn Mydland for god hjelp og tilbakemeldinger underveis, og biveileder Dr. Alemayehu Kidane for hjelp både på labben, med utregninger og statistikk og tips og råd underveis. Vil også takke Elise Hatch Fure for hjelp og veiledning på labben, og sist men ikke minst mamma og pappa for all hjelp og støtte under hele studietiden.

Ås, 15 juni 2020

Thea Brustad

.....
Thea Brustad

Sammendrag

Konservering av grovfôr er en nødvendighet i Norge for å kunne sikre dyra tilgang på mat gjennom vinterhalvåret. God kvalitet på det konserverte fôret er viktig for å kunne opprettholde en god produksjon og produktkvalitet hele året. Bruk av ensileringsmidler lar en i større grad styre gjæringen og er dermed en viktig faktor for å kunne sikre en vellykket gjæring og god fôrkvalitet.

Formålet med denne oppgaven er å vurdere effekten til ulike ensileringsmidler og ulike kombinasjoner av syrer, kjemiske stabilisatorer, bakterier og enzymer på kjemisk sammensetning, aerobisk stabilitet og *in vitro* vomnedbrytning av fiber. Forsøket ble utført gjennom Foods of Norway ved Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap (IHA) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) i perioden oktober 2019 til april 2020.

Det var til sammen 36 ulike behandlinger som ble ensilert og testet i dette forsøket.

Forsøksmaterialet besto av en batch seint høstet gras, som ble ensilert med ulike ensileringsmidler og kombinasjoner av ensileringsmiddel og enzymer. Prøvene kun tilsatt ensileringsmidler ble ensilert ved to ulike TS-nivåer (14,6 % og 36 %), og de ulike ensileringsmidlene besto av; Uten tilsetning (kontroll), Maursyre 85 %, GrasAAT Lacto, GrasAAT Plus, GrasAAT SX, Kofasil LP, Kofasil Ultra, Xtrasil Bio Lp (3 L/tonn grasmasse) og Xtrasil Bio Lp (6 L/tonn grasmasse). I tillegg ble 4 ulike enzymer benyttet (hemicellulase =H, cellulase=C, xylanase=X og pektinase =P) for tre av ensileringsmidlene (Uten tilsetning, Maursyre 85 % og Xtrasil Bio Lp (3 L/tonn grasmasse)) i seks ulike kombinasjoner; H (5000 U/kg gras), H (10 000 U/kg gras), H+C (2 x 5000 U/kg gras), H+X (2 x 5000 U/kg gras), H+P (2 x 5000 U/kg gras) og H+C+X+P (4 x 5000 U/kg gras).

Måling av aerobisk kvalitet startet rett etter åpning av posene og varte over en periode på 14 dager. Romtemperaturen og temperaturen i prøvene ble målt daglig. I tillegg ble muggdannelse i prøvene notert fortløpende. På dag 14 ble muggdannelsen i hver enkelt prøve vurdert på en skala fra 1-6, hvor 1 betyr ingen muggdannelse og 6 betyr muggdannelse i svært høy grad. Midler som inneholdt sopphekkende stoffer og fortørking ga økt aerobisk stabilitet, mens enzymer reduserte den aerobiske stabiliteten.

Prøver til kjemisk sammensetning ble tatt ut direkte etter åpning av ensileringsposene. Maursyreholdige ensileringsmidler ga generelt lavere pH og høyere andel vannløselige karbohydrater (WSC) i det ferdig ensilerte fôret, mens enzymer økte andel WSC og reduserte andelen ADF og NDF etter ensilering, hvorav cellulasebehandling hadde størst effekt.

Fortørking resulterte i høyere pH, økt innhold av ADF og NDF, og lavere andel WSC i det ferdig ensilerte fôret.

In vitro fordøyelighet ble målt med Ankom Daisy II inkubator, hvor 2 prøver fra hver behandling ble inkubert på 5 ulike tidspunkter; 0 timer, 12 timer, 24 timer, 48 timer og 96 timer. Resultatene ble brukt til bestemmelse av *in vitro* sann fordøyelighet av TS (IVTD %) og nedbrytning av NDF. Enzymbehandlingene, spesielt cellulasebehandlede, ga økt IVTD %, mens fortørking reduserte IVTD %. Verken ensileringsmidler, enzymer eller fortørking hadde noen bestemt effekt på nedbrytningen av NDF, og forskjeller mellom behandlingene i de ulike kategoriene stammer trolig fra andelen og omfanget av nedbrytningen av ulike NDF-fraksjoner under inkuberingen. Men ensilering med Maursyre 85 % sammen med H (5000 U) skilte seg ut med en betydelig høyere nedbrytning av NDF etter 96 timer enn de resterende enzymbehandlingene.

Gassproduksjonen (GP) ble målt med Ankom gassproduksjonssystem ved 72 timers inkubering av tre replikater fra hver behandling. I tillegg ble TS-fordøyeligheten beregnet ut fra andelen inkubert prøve som ble brutt ned under inkuberingen. Verken ensileringsmiddel, enzymer eller fortørking så ut til å direkte påvirke GP under inkuberingen, og gapet mellom behandlinger stammer derfor trolig fra variasjoner i den kjemiske sammensetningen mellom de ulike behandlingene som følge av forskjeller i fermenteringen under ensileringsprosessen. Behandlinger med maursyreholdig ensileringsmiddel ga generelt høyere andel nedbrutt TS (GP), med unntak av GrasAAT Lacto.

Abstract

Preservation of roughage is a necessity in Norway to ensure animals feed during the winter months. Good quality of silage is important to maintain a good production and product quality throughout the year. The use of silage additives allows for more control during the fermentation and is therefore an important factor to ensure successful fermentation and good feed quality.

The purpose of this thesis was to assess the effect of various enzymes and different combinations of acids, chemical stabilizers, bacteria and enzymes on chemical composition, aerobic stability and *in vitro* rumen degradation of fiber. The experiment was conducted through Foods of Norway at Department of Animal and Aquacultural Sciences (IHA) at Norwegian University of Life Sciences (NMBU) during the period October 2019 to April 2020.

36 different treatments were ensiled and tested in this experiment. The test material consisted of a batch of late harvested grass, ensiled with various ensiling additives and combinations of additives and enzymes. The samples with only additives were ensiled at two different DM levels (14,6 % and 36 % DM), and the additives consisted of; No additive (control), Formic acid 85 %, GrasAAT Lacto, GrasAAT Plus, GrasAAT SX, Kofasil LP, Kofasil Ultra, Xtrasil Bio Lp (3 L/ton grass) and Xtrasil Bio Lp (6 L/ton grass). In addition, 4 different enzymes were used (hemicellulase =H, cellulase=C, xylanase=X and pectinase =P) together with three different additives (No additive, Formic acid 85 % and Xtrasil Bio Lp (3 L/ton grass)) in six different combinations; H (5000 U/kg grass), H (10 000 U/kg grass), H+C (2 x 5000 U/kg grass), H+X (2 x 5000 U/kg grass), H+P (2 x 5000 U/kg grass) and H+C+X+P (4 x 5000 U/kg grass).

Measurements of the aerobic stability of each feed started right after opening of the ensiled samples, and lasted for a period of 14 days. The room temperature and the temperature in all the different treatments were measured daily. The formation of mold in the samples was recorded daily. On day 14, the mold development in each sample was evaluated on a scale from 1-6, with 1 being no mold and 6 being mold development to a very high degree.

Additives containing antifungal substances, as well as wilting increased the aerobic stability, while the use of enzymes reduced the aerobic stability of the feed.

Samples for analyses of the chemical composition were taken directly after opening. Feed treated with additives containing formic acid generally had a lower pH, and more water-

soluble carbohydrates (WSC) after ensiling than other additives. Enzymes increased the amount of WSC, and decreased the amount of ADF and NDF in the ensiled material, whereas samples treated with cellulase had a greater effect than other enzyme-treatments. Wilting resulted in higher pH, increased ADF and NDF content and decreased level of WSC.

In vitro digestibility was measured with the Ankom Daisy II incubator, where two samples from each treatment were incubated at five different time points; 0h, 12h, 24h, 48h and 96h. The results were used to determine *in vitro* true digestibility of DM (IVTD %), as well as the degradation of NDF. Enzyme treated silage, especially cellulase-treated, increased IVTD %, while wilting reduced IVTD %. Neither additives, enzymes nor wilting had any specific effect on the degradation of NDF. Differences between treatments in the different categories probably originates from the proportion and extent of degradation of different NDF fractions during incubation. However, silage with Formic acid 85% together with H (5000 U) stood out with much higher degradation of NDF after 96h, than all the remaining enzyme treatments.

Gas production (GP) was measured with the Ankom gas production system at 72h incubation with three replicates of each treatment. In addition, DM digestibility was calculated from the amount of incubated sample that was left after incubation. Neither the additives, enzyme nor wilting appeared to directly affect the GP, and the differences in GP between treatments are probably related to variations in the chemical composition due to differences in the fermentation during the fermentation-process. Treatments with formic acid generally had an increased DM digestibility (GP), with the exception of GrasAAT Lacto.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	1
2. Teori.....	2
2.1 Ensilering.....	2
2.2 Morfologisk utviklingsstadium	2
2.3 Ensileringsprosessen	3
2.3.1 Aerob fase.....	3
2.3.2 Fermenteringsfasen.....	4
2.3.3 Lagringsfasen	4
2.3.4 Uttaksfasen	4
2.4 Fortørking.....	5
2.5 Aerob stabilitet	5
2.6 Ulike mikroorganismer:.....	6
2.6.1 Melkesyrebakterier	8
2.6.2 Klostridier.....	8
2.6.3 Enterobakterier	9
2.6.4 Gjærsopp	10
2.6.5 Muggsopp.....	10
2.7 Ensileringsmidler.....	11
2.7.1 Fermenteringsstimulatorer.....	11
2.7.2 Fermenteringshemmere	12
2.7.3 Bedret aerob stabilitet.....	13
2.8 Ulike kvaliteter	14
2.8.1 Næringsverdi	14
2.8.2 Gjæringskvalitet	15
2.8.3 Hygienisk kvalitet.....	16
2.9 Fiber	16
2.9.1 Cellulose.....	17
2.9.2 Hemicellulose	17
2.9.3 Lignin	17
2.10 Ulike metoder for å bestemme vomfordøyelighet.....	18
2.10.1 <i>In vivo</i> vomfordøyelighet	18
2.10.2 <i>In situ</i> vomfordøyelighet	18
2.10.3 <i>In vitro</i> vomfordøyelighet.....	19
3. Material og metode.....	20
3.1 Pakking.....	20

3.2	Åpning.....	21
3.3	Aerobisk stabilitet.....	22
3.4	Standard TS bestemmelse.....	22
3.5	Frysetørking.....	22
3.5.1	<i>In vitro</i> vomnedbrytning: Daisy II inkubator	23
3.5.2	<i>In vitro</i> vomnedbrytning; ANKOM Gassproduksjonssystem	24
3.6	Kjemiske analyser	25
3.7	Beregninger	26
3.7.1	Ankom Daisy: <i>In vitro</i> sann fordøyelighet (IVTD).....	26
3.7.2	Ankom Daisy: Nedbrutt NDF	26
3.7.3	Ankom gassproduksjonssystem: Konvertering av trykk til gassproduksjon	26
3.7.4	Ankom gassproduksjonssystem: Beregning av estimert kurve	27
3.7.5	Ankom gassproduksjonssystem: Beregning av % TS nedbrutt.....	27
3.8	Statistikk.....	28
4.	Resultater	29
4.1	Aerob stabilitet	29
4.2	Kjemisk innhold	30
4.2.1	Effekt av ulike ensileringsmidler på kjemisk innhold	32
4.2.2	Effekt av ulike enzymer på kjemisk innhold	32
4.2.3	Effekt av fortørking på kjemisk innhold.....	32
4.3	<i>In Vitro</i> vomnedbrytning: Ankom Daisy II inkubator.....	33
4.3.1	<i>In vitro</i> sann fordøyelighet (IVTD%).....	33
4.3.2	Nedbrutt NDF.....	36
4.4	<i>In Vitro</i> vomnedbrytning: Ankom gassproduksjonssystem.....	40
4.4.1	Effekt av enzymer på gassproduksjonen	40
4.4.2	Effekt av fortørking på gassproduksjonen.....	42
5.	Diskusjon.....	44
5.1	Aerob stabilitet	44
5.2	Kjemisk innhold	45
5.2.1	Effekt av ensileringsmidler på kjemisk innhold	45
5.2.2	Effekt av enzymer på kjemisk innhold	47
5.2.3	Effekt av fortørking på kjemisk innhold.....	48
5.3	<i>In Vitro</i> vomnedbrytning: Daisy II.....	49
5.3.1	<i>In vitro</i> sann fordøyelighet av tørrstoff.....	49
5.3.2	Nedbrytning av NDF.....	51
5.4	<i>In Vitro</i> vomnedbrytning: Gassproduksjon	51
5.5	Forskjeller mellom GP og Daisy i nedbrytning av TS	54

5.6	Økonomiske aspekter og bærekraft	54
6.	Konklusjon	55
6.1	Videre arbeid	56
7.	Referanser	57
Vedlegg	63
	Vedlegg 1: Bufferløsninger in vitro; Daisy II inkubator	63
	Vedlegg 2: Bufferløsninger in vitro; Ankom Gassproduksjon.....	63
	Vedlegg 3: IVTD % (TS basis): Effekt av fortørking	64
	Vedlegg 4: Fordøyelighet av TS og NDF beregnet ved bruk av Daisy II inkubator.....	65
	Vedlegg 5: A, B og C parametere beregnet ut fra gassproduksjonsmetoden	67
	Vedlegg 6: Korrelasjon mellom kjemiskinnhold og in vitro data	70

Ordforklaring

ADF: Acid Detergent Fiber

ADFom: Askekorrigert Acid Detergent Fiber (ADF)

aNDFom: Askekorrigert, amylase-behandlet Neutral Detergent Fiber (NDF)

C: Cellulase

GP: Gassproduksjon

H: Hemicellulase

HTS: Høyt tørrstoff

INDF: Ufordøyelig Neutral Detergent Fiber (NDF)

IVTD %: In vitro sann fordøyelighet av tørrstoff

LAB: Melkesyrebakterier

LTS: Lavt tørrstoff

NDF: Neutral Detergent Fiber

NFCee: Ikke fiber karbohydrat + eter ekstrakt kalkulert som: $1000 - (\text{NFD} + \text{råprotein} + \text{aske})$

P: Pektinase

r: korrelasjon

RP: Råprotein

TS: Tørrstoff

WSC: vannløselige karbohydrater

X: Xylanase

1. Innledning

I Norge og andre land som ikke har tilgang på grovfôrvekster hele året, er det en nødvendighet å kunne konservere og lagre grovfôr for å sikre dyra mat gjennom vinterhalvåret (Søegaard et al., 2003). Ensilering er i dag den dominerende konserveringsmetoden i Norge (Harstad, 2016), og surfôr er det viktigste fôrmiddelet til melkekyr da det utgjør ca 45 % av energiinntaket. Kvaliteten på fôret er viktig for å sikre et høyt opptak og en god produksjon (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013).

Biokjemien i ensileringsprosessen er i teorien relativ enkel. Det er ønskelig at melkesyrebakterier omdanner enkle karbohydrater til melkesyre gjennom anaerob fermentering. Økt mengde melkesyre reduserer pH, og det sure miljøet hemmer all mikrobiell aktivitet. Dette gir et stabilt surfôr som kan lagres over lengre perioder. I praksis er derimot denne prosessen mer komplisert da forholdene i både start og slutfasen er aerobe. I tillegg kan andre substrater enn sukker brukes som næring, og både planteenzymer, mikroorganismer og melkesyrebakterier konkurrerer om næringsstoffene (Mo, 2005). Om melkesyrebakteriene «taper» denne konkurransen kan det oppstå feilgjæring.

I dette forsøket sammenlignes effekten av ulike ensileringsmidler, samt ulike kombinasjoner av ensileringsmidler og enzymer på kjemisk sammensetning, aerobisk stabilitet og *in vitro* vonnedbrytning. Formålet med undersøkelsene er å bedre forståelsen for hvordan ulike ensileringsmidler og enzymer påvirker fôrkvaliteten og fiberfordøyelsen. Forsøket ble utført gjennom Foods of Norway ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) i perioden okt. 2019 til april 2020.

2. Teori

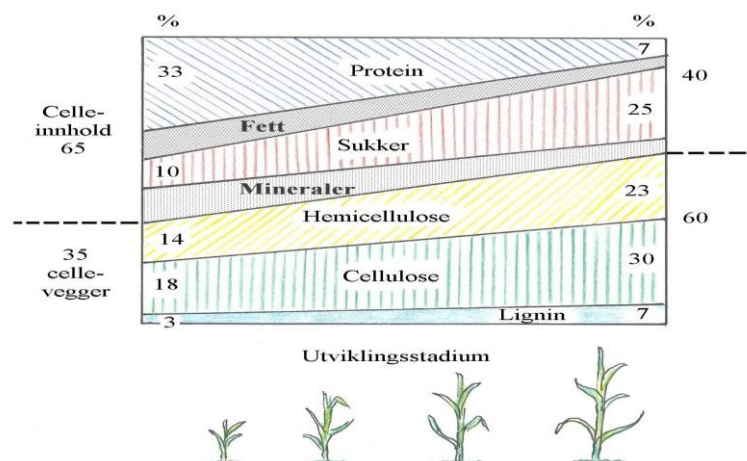
2.1 Ensilering

Ensilering er konservering av ferskt eller svakt tørket plantemateriale til fôr under anaerobe forhold (uten oksygen) og lav pH (under 4,8) som hindrer skadelig gjæring. Det ferdige produktet kalles ensilage, surfôr eller silofôr (Christensen & Bratberg, 2018), og produseres ved kontrollert fermentering av planter. Nesten enhver plante kan konserveres som ensilage, men de vanligste er gras, belgvekster, og helt korn (mais, hvete) (McDonald et al., 2011).

Det er flere metoder å lagre surfôret på, og tidligere var tårn- og plansilo den dominerende lagringsmetoden i Norge (Store Norske Leksikon, 2018b). I dag er rundballer den mest brukte metoden, og ca 40 % av grovfôret i Norge blir lagret på denne måten (Store Norske Leksikon, 2018a)

2.2 Morfologisk utviklingsstadium

Eng- og beiteplanters morfologiske utviklingsstadium har stor innvirkning på næringsverdien. Utviklingsstadiumet har som vist i figur 1 stor innvirkning på plantens kjemiske sammensetning, samt andre egenskaper som påvirker fordøyeligheten av plantene. Dette relateres til forholdet mellom blad og stengel som endres i takt med utviklingsstadiet (Harstad, 2016). Ungt plantemateriale består av 65 % celleinnhold (protein, fett, sukker og mineraler) og 35 % celleveggstoffer (NDF), mens det i senere utviklingsstadium (ved blomstring) består av 40 % celleinnhold og 60 % celleveggstoffer. Fra ungt plantemateriale til blomstring er innholdet av lignin mer enn fordoblet, og fordøyeligheten av NDF er sterkt redusert (Kung, 1998; Mo, 2005) da ligninet «kapsler inn» NDF-fraksjonen (lignifisering), og gjør den mindre tilgjengelig for fordøyelse (Harstad, 2016; Kung, 1998). Fordøyeligheten av fôrmiddelet er dermed i stor grad avhengig av hvor stor del av NDF fraksjonen som er lignifisert (Mo, 2005).



Figur 1: Virkning av utviklingsstadiet på kjemisk sammensetning av gras (Harstad, 2016).

2.3 Ensileringsprosessen

Den naturlige fermenteringsprosessen er ukontrollerbar og kan føre til mindre optimal bevaring av næringsstoffer. Tilsetninger som ensileringsmidler og enzymer kan benyttes for å styre fermenteringen i ønsket retning og dermed forbedre ensileringsprosessen, gi produktet en bedre energi- og næringsstoffverdi, og senere forbedre dyrets produksjon (Kung, 1998).

Kontrollert fermentering oppnås ved å optimalisere vekstforholdene for ønskede mikroorganismer, og samtidig hemme uønskede mikroorganismer. I tillegg kreves det at plantematerialet oppbevares under anaerobe forhold. Flere aerobe mikroorganismer som naturlig finnes i graset vil i kontakt med luft raskt omdanne fôret til et ubrukelig og muligens giftig materiale (Mo, 2005).

Ved en vellykket fermentering vil melkesyrebakterier (LAB), som følger med graset inn i siloen, omdanne enkle sukkerarter til melkesyre gjennom anaerob fermentering (Weinberg & Ashbell, 2003). Når mengden melkesyre har nådd et visst nivå vil pH bli så lav at store deler av den mikrobielle aktiviteten vil opphøre. Dette gjør fôret lagringsdyktig i lang tid (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013).

Ensileringsprosessen kan deles inn i fire faser som består av den aerobe fasen, fermenteringsfasen, lagringsfase og uttaksfasen (Kung, 1998; Lallemand, u.å.; Mo, 2005; Pahlow et al., 2003; Weinberg & Ashbell, 2003).

2.3.1 Aerob fase

Den første fasen er karakterisert ved tilstedeværelsen av oksygen etter at gaset er kuttet og pakket, og kan vare i flere timer. Oksygenet brukes opp gjennom plantenes respirasjon og til vekst av mikroorganismer som mugg, gjær og enterobakterier (Kung, 1998; Lallemand, u.å.). Plantesukker omdannes til karbondioksid, vann og varme (University of Wisconsin, 2010), proteaser bryter ned proteiner til peptider og frie aminosyrer, og karbohydraser kan spalte mer komplekse karbohydrater som hemicellulose til enkle sukkerarter (Mo, 2005). Overflødig oksygen kan dermed føre til uønsket vekst av mugg- og gjærsopp, nedbrytning av protein og overdreven varmeproduksjon (Kung, 1998).

Optimal fermentering kan begynne når alt oksygenet er eliminert, og oppnås hurtigst gjennom rask pakking, jevn fordeling under oppbevaring, riktig kuttelengde og ved å ha anbefalt tørrstoffnivå for lagringsmetoden (Kung, 1998).

2.3.2 Fermenteringsfasen

Fermenteringsfasen starter når oksygenet er oppbrukt, og anaerobe bakterier vokser og blir mer aktive (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013). Fermenteringen er hovedsakelig kontrollert av typen mikroorganismen som dominerer fermenteringen, tilgjengelig substrat (vannløselige karbohydrater) for mikrobiell vekst, og andelen vann i planten (Kung, 1998). I denne fasen konkurrerer teoretisk sett anaerobiske mikroorganismer som enterobakterier, klostridier (smørsyrebakterier) og gjær med LAB om næringsstoffer som i økende grad frigjøres fra planteceller og vev som går i oppløsning (Pahlow et al., 2003).

Antallet enterobakterier øker kraftig i første del av fasen, og det blir produsert noe eddiksyre og ammoniakk. Ved god næringstilgang vil etter hvert melkesyrebakteriene få en sterk framvekst, (Mo, 2005) og vil, ved en vellykket gjæring, gradvis bli mer og mer dominerende i massen etter hvert som pH synker (Oude Elferink et al., 2000), og enterobakteriene vil mer eller mindre forsvinne (Mo, 2005).

2.3.3 Lagringsfasen

Melkesyreproduksjonen fortsetter og når sitt høyeste nivå. Perioden varer omkring 2 uker, eller til all bakterievekst blir hemmet av lav pH (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013). Under lagringsfasen vil pH i fôret forbli stabilt lav (University of Wisconsin, 2010), og kun syretolerante enzymer fortsetter å være aktive. Disse forårsaker en sakte hydrolyse av strukturdannende karbohydrater som hemicellulose og andre kompliserte lagringskarbohydrater. Hydrolysen gir en viktig og kontinuerlig forsyning av vannløselige karbohydrater (WSC), og er dermed en liten kompensasjon for det uunngåelige tapet av substrat som skjer ved langvarig fermentering (Mo, 2005). Proteaser vil også kunne omdanne proteiner og andre komplekse N-forbindelser til ammoniakk (NH_3). Selv ved svært lav pH vil flere syretolerante gjærarter kunne overleve i en nærmest inaktiv tilstand, mens bacilli og klostridier kan overleve i form av sporer (Pahlow et al., 2003).

2.3.4 Uttaksfasen

Fjerde og siste fase av fermenteringen er under åpning og eksponering til oksygen (Kung, 1998). Pakke kvaliteten av fôret og utstyr brukt til uttak avgjør hvor langt oksygenet har trengt inn i massen. Lufteksponeringen er nok til at mikroorganismer som mugg og gjær blir aktive og starter å formere seg (Honig & Woolford, 1980). Økende lufttilgang i utføringsfasen øker dermed faren for vekst av uønskede mikroorganismer, og dermed også faren for varmgang og redusert fôr kvalitet (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013). Lufttette siloer og fjerning av tilstrekkelig masse under uttak kan forhindre aerobisk forringing av fôret (Kung, 1998). Tap

knyttet til utføring avhenger av den aerobe stabiliteten til fôret, samt eksponeringstiden til luft (Honig, 1991).

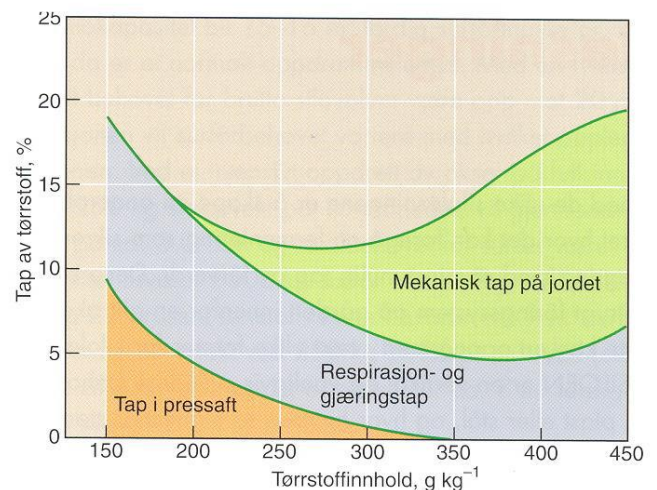
2.4 Fortørking

Ensilingen er i stor grad påvirket av tørrstoffinnholdet i fôret da det affekterer fermenteringen, mengden pressaft, pakkingen av fôret og fôrets varmekapasitet. Selve fermenteringen skjer i vannfasen der mikroorganismene finnes. Likevel kreves det også at det finnes substrat (sukker) oppløst i vannfasen om det skal oppstå fermentering. Sukkeret, som finnes i cytoplasma inne i plantecellene, entrer vannfasen ved at celleveggene ødelegges, og cytoplasmaet blir frittflytende (Harstad, 2016).

Fortørking gir mindre vann i fôret, og er dermed en effektiv måte å endre mikrobenes miljø i surfôrmassen (Mo, 2005). Melkesyrebakterier har lettere for å dominere fermenteringen ved høyt innhold av tørrstoff da de tolererer høyere tørrstoffinnhold bedre enn andre mikroorganismer som for eksempel klostridier (smørsyrebakterier) som er svært sensitive og krever svært fuktige forhold for maksimal vekst.

Økt tørrstoffinnhold i fôret øker konsentrasjonen av løselige stoffer i vannfasen, som igjen øker det osmotiske trykket. Melkesyrebakterier er mer motstandsdyktige mot økt osmotisk trykk enn smørsyrebakterier og blir dermed i mindre grad påvirket av dette (Harstad, 2016). Fortørking kan dermed brukes som en alternativ metode for å begrense veksten av uønskede mikroorganismer (Mo, 2005).

Figur 2 viser en oversikt over ulike former for tørrstofftap ved ensilering av gras med ulike grader av fortørking. Figuren indikerer optimalt tørrstoffinnhold i fôret med tanke på tørrstofftap er ved ca 30 %. Lavt innhold av TS vil gi stort tap gjennom pressaft og respirasjon- og gjæringstap, mens et høyt TS innhold vil gi et større mekanisk tap på jordet.



Figur 2. Ulike former for tørrstofftap ved ulike grader av fortørking (Mo, 2005).

2.5 Aerob stabilitet

Aerob stabilitet er et mål på hvor god holdbarhet surfôret har i kontakt med luft før det oppstår varmgang (Kung Jr, 2010). Temperaturøkningen kommer som et resultat av mikrobiell oksidasjon av syrer og WSC til CO₂ og vann (Ranjit & Kung, 2000). Surfôr med

høyere tørrstoffinnhold har ofte en større temperaturøkning enn surfôr med lavere tørrstoffinnhold. En forklaring på dette er at mengden varme som kreves for å øke temperaturen i fôrmaterialiet øker med synkende tørrstoffinnhold (Crawshaw & Woolford, 1979; McDonald et al., 1991). En annen forklaring er at surfôr med høyt tørrstoffinnhold generelt har et lavere innhold av eddiksyre som øker den aerobiske stabiliteten, og høyere innhold av sukker som reduserer den aerobiske stabiliteten enn surfôr med lavere tørrstoffinnhold (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013).

Lave konsentrasjoner av melkesyre og relativt høy pH i surfôret gir muggsoppen mulighet til å vokse og spre seg til synlige masser (McDonald et al., 1991). Synlig mugg i surfôr som er eksponert til luft er derfor en indikator på at det har skjedd en omfattende aerobisk forringelse.

Høy aerobisk stabilitet oppnås gjennom rask og intensiv pH senkning, god ensileringsteknikk og ved å unngå vekst av gjær og mugg. Selv ved optimal lufteliminering under alle faser i ensileringsprosessen er det risiko for dårlig aerobisk kvalitet om pH senkningen ikke er tilstrekkelig, for eksempel grunnet utilstrekkelig mengde melkesyrebakterier i massen. I disse tilfellene kan en høy tilgjengelighet av næringsstoffer forverre den aerobiske stabiliteten (Honig, 1991).

Fôr bør testes for potensiell aerobisk stabilitet i minst 10 dager (240 t) da dette er beregnet tid fôret er utsatt for oksygen etter åpning (Wilkinson & Davies, 2013). De ti dagene inkluderer oksygeneksponering i siloen, under uttak, under oppbevaring i fôringsutstyr og tiden fôret ligger på fôrbrettet.

2.6 Ulike mikroorganismer:

Sammensetningen av mikrofloraen spiller en viktig rolle for hvordan kvaliteten på surfôret blir. Floraen kan deles inn i to ulike grupper; en ønsket bestående av melkesyrebakterier, og en uønsket bestående av mikroorganismer som enten gir anaerob forringelse som klostridier og enterobakterier, eller aerob forringelse som gjær- og muggsopp (Oude Elferink et al., 2000). Flere av de uønskede mikroorganismene kan gi dårligere fôr kvalitet, og ha en skadelig effekt på både dyrehelse og melkekvaliteten.

Den mikrobielle floraen i gras er vesentlig forskjellig både i sammensetning og antall fra den mikrobielle floraen under gjæringsforløpet og i det ferdig ensilerte fôret (Mo, 2005). Grunnen

er at de aerobe mikroorganismene som dominerer i grasmassen blir utkonkurrert av anaerobe bakterier under ensileringsprosessen (McDonald et al., 2011). Tabell 1 viser en oversikt over ulike typer melkesyrebakterier, klostridier og enterobakterier, samt deres fermenteringsveier og -produkter.

Tabell 1: Noen fermenteringsveier ved ensilering (McDonald et al., 2011)

Melkesyrebakterier
<i>Homofermentative</i>
Glukose → 2 melkesyre
Fruktose → 2 melkesyre
Pentose → melkesyre + eddiksyre
<i>Heterofermentative</i>
Glukose → melkesyre + etanol + CO ₂
3 fruktose → melkesyre + 2 mannitol + eddiksyre + CO ₂
Pentose → melkesyre + eddiksyre

Klostridier
<i>Sakkorolytiske</i>
2 melkesyre → smørsyre + 2CO ₂ + 2H ₂
<i>Proteolytisk</i>
<i>Deaminering</i>
Glutaminsyre → eddiksyre + pyruvat-syre + NH ₃
Lysin → eddiksyre + smørsyre + 2NH ₃
<i>Dekarboksylering</i>
Arginin → putriscine + CO ₂
Glutaminsyre → γ-aminosmørsyre + CO ₂
Histidin → histamin + CO ₂
Lysin → cadaverine + CO ₂
<i>Oksidering/reduksjon (Stickland)</i>
Alanin + 2 glysin → 3 eddiksyre + 3NH ₃ + CO ₂

Enterobakterier
Glukose → eddiksyre + etanol + 2CO ₂ + 2H ₂

2.6.1 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier er den bakteriegruppen det er ønskelig med vekst av i surfôret, og de kan formere seg både under aerobe og anaerobe forhold (fakultativt anaerobe). Bakterien finnes naturlig på graset i små mengder, og formerer seg vanligvis hurtig etter høsting. De fortsetter å vokse under fermenteringsprosessen hvor de hovedsakelig fermenterer sukker til melkesyre som reduserer pH i grasmassen (McDonald et al., 2011). Under fermenteringen er det melkesyre som har størst påvirkning på pH-senkningen i massen (Hansen, 2014; Kung et al., 2018). Mengden melkesyre som dannes under ensileringsprosessen avhenger av mengden og typen melkesyrebakterier som befinner seg i og på fôret, samt tilgangen på substrat (McDonald et al., 1991). Seks ulike arter av melkesyrebakterier er ofte knyttet til surfôr; *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* og *Streptococcus* (McDonald et al., 1991; Oude Elferink et al., 2000).

De fleste melkesyrebakterier som finnes i surfôr kan vokse i temperaturer mellom 5 - 50 °C, med et optimum mellom 25 - 40°C (Mo, 2005; Oude Elferink et al., 2000). I tillegg er melkesyrebakterier svært syretolerante, og noen kan fortsette å produsere syre helt ned til pH 3,5 (Mo, 2005).

Melkesyrebakteriene blir ofte inndelt i to grupper på grunnlag av hvordan de fermenterer heksoser til melkesyre. Første gruppe er de homofermentative melkesyrebakteriene som kun har melkesyre som sluttprodukt. Den andre gruppen består av heterofermentative melkesyrebakterier. Disse produserer, som vist i tabell 1, andre sluttprodukter i tillegg til melkesyre (Mo, 2005; Oude Elferink et al., 2000; Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013). I teorien er homofermentativ fermentering mest ønskelig da det gir mer melkesyre og mindre tap av næringsstoffer og energi enn heterofermentativ fermentering. Homofermentativ fermentering gir i tillegg vanligvis både høyere energiinnhold i fôret og høyere fôropptak enn heterofermentativ fermentering (Mo, 2005).

2.6.2 Klostridier

Klostridier eller smørsyrebakterier er sporedannende anaerobe bakterier som kan fermentere karbohydrater, melkesyre og proteiner. Sakkarolytiske klostridier fermenterer sukker og melkesyre til smørsyre, eddiksyre, CO₂ og H₂ (McDonald et al., 2011; Mo, 2005). De proteolytiske klostridiene som finnes i surfôr kan fermentere både aminosyrer og karbohydrater til ulike fermenteringsprodukter som aminer, ammoniakk, CO₂, organiske syrer og etanol. Både sakkarolytiske og proteolytiske klostridier kan skape problemer med redusert

fôrverdi. I tillegg kan dannelse av biogene aminer fra proteolytiske klostridier gi redusert smakelighet på fôret (Oude Elferink et al., 2000).

Klostridier kan påvirke melkekvaliteten da et høyt innhold av smørsyresporer i surfôret kan forårsake smørsyresporer i melka. Dette kan gi problemer med melke- og ostekvaliteten på meieriet (Mo, 2005), samt kvalitetstrekk ved levering (Eurofins, 2018a). Smørsyresporene fra fôret passerer gjennom kuas fordøyelseskanal og havner til slutt i melka gjennom gjødsel og fekal kontaminering av juret (Oude Elferink et al., 2000) En sterk utvikling av smørsyresporer i fôret stammet oftest fra forurensning av graset under høsting, ikke av feilgjæring (Ruud, 2015). Både gjødsel og jord inneholder smørsyresporer (Eurofins, 2018a), men jordpartikler er den mest utbredte årsaken til høyt sporeinnhold i fôret (Ruud, 2015). For å minimere jordforurensning av plantematerialet under innhøsting bør ikke stubbhøyden ved innhøsting være mindre enn 10-12 cm (Mo, 2005).

Sporene er en deaktiv form av smørsyrebakterien, men kan under gunstige miljøforhold bli aktive og levende (Eurofins, 2018a). Smørsyrebakterier formerer seg kun under anaerobe forhold, og er avhengig av relativt høy fuktighet og pH. Viktigste tiltak for å redusere problemet er å fortørke fôret, raskt redusere pH og unngå jordforurensning (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013).

2.6.3 Enterobakterier

Det finnes flere ulike typer enterobakterier, men de vanligste i surfôr er *Escherichia coli* og *Erwinia herbicola* (McDonald et al., 2011). Enterobakteriene er fakultativt anaerobe, men er avhengig av WSC til anaerob vekst (Mo, 2005). Vekst av enterobakterier i surfôret er ikke ønskelig da de konkurrerer med melkesyrebakteriene om tilgjengelig substrat (Oude Elferink et al., 2000). Substratet blir fermentert til eddiksyre, etanol, CO₂ og H₂ (McDonald et al., 2011), og har, sammenlignet med melkesyre, liten effekt på pH-senkningen i massen (Haavik, 2017). I likhet med klostridier kan også enterobakterier dekarboksylere og deaminere aminosyrer til store mengder ammoniakk (McDonald et al., 2011), samt redusere nitrat (Oude Elferink et al., 2000).

Enterobakteriene er vanligvis kun aktive i starten av fermenteringen da optimal pH for vekst er rundt 7,0 (McDonald et al., 2011). En liten reduksjon i pH vil raskt oppføre veksten, og en pH under 4,5 vil ta livet av enterobakteriene (Mo, 2005).

Det er ønskelig å raskest mulig hemme veksten av enterobakteriene da det vil begrense fermenteringen av WSC til blant annet eddiksyre, og nedbrytningen av aminosyrer til

ammoniakk (Mo, 2005). Selv om de fleste enterobakterier er ikke-patogene inneholder likevel enkelte typer som for eksempel *Klebsiella aerogenes* og *Escherichia coli* patogener som kan gi sykdom hos dyr og mennesker.

2.6.4 Gjærsopp

Gjærsopp spiller en viktig rolle i forringelsen av fôret ved lufteksponering (McDonald et al., 2011). Mye gjærsopp i fôret påvirker lagringsstabiliteten og fôropptaket, men har i seg selv ingen kjente negative helseeffekter (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013). Propionsyre og eddiksyre er kjent for å hemme vekst av gjær i surt miljø (Moon, 1983). De vanligste gjærtyperne i surfôr er *Candida*, *Saccharomyces* og *Torulopsis* (McDonald et al., 2011).

Under anaerobe forhold vil mange gjærtyper fermentere ulike sukker til fortrinnsvis etanol og CO₂. Produksjonen av etanol reduserer mengden sukker tilgjengelig for LAB, og kan gi fôrsmak på melka (Randby et al., 1999). Ved aerobe forhold vil fermenteringen stoppe opp til fordel for aerob respirasjon, og soppen vil i tillegg til sukker bruke ulike organiske syrer og alkoholer som substrat (McDonald et al., 1991; Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013). Melkesyre brytes ned til CO₂ og H₂O, som kan forårsake en økning i pH og trigge vekst av andre uønskede mikroorganismer (McDonald et al., 1991).

Andelen gjærsopp i graset varierer en god del (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013), mens andelen gjærsopp i fôret ofte øker med økende TS innhold da det er vanskeligere å få silo og rundballer luftfri under pakking og lagring (Eurofins, 2018a). Tiltak som rask ilegging, god pakking og riktig dosering av ensileringsmiddel kan begrense gjærsoppens aktivitet og dermed forringelse av silomassen.

2.6.5 Muggsopp

Mugg kan vokse på graset både før slått og under lagring når det er luft tilstede (Selmer-Olsen, 2005). Under lagring mugner vanligvis kun overflaten, men ved åpning og utfôring av siloen kan hele fôrmassen mugne (Oude Elferink et al., 2000).

Ved luftlekkasje under lagring kan mugg av artene *Penicillium roqueforti*, *Byssochlamys nivea* og *Monascus ruber* bli dominerende da de tåler lav oksygenkonsentrasjon, lav pH, høy CO₂ konsentrasjon og høyt innhold av organiske syrer bedre enn andre arter (Mo, 2005). De vanligste muggartene i surfôr er *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* og *Mucor*,

Mugg i fôret gir redusert fôrverdi, smakelighet (Oude Elferink et al., 2000) og er direkte helseskadelig for både mennesker og dyr (Driehuis et al., 2018). Soppen kan i seg selv være

sykdomsfremkallende, eller skape problemer gjennom produksjon av giftstoffer (mykotoksiner). Mugg påvirker blant annet luftveier, mage og tarm, og kan gi redusert fôropptak og i noen tilfeller forårsake hormonell ubalanse og abort (Eurofins, 2018a).

Ensileringsmetoder som minimerer luft i massen, og tilsetningsmidler som hindrer aerobiske forringelse vil forhindre eller begrense muggvekst (Oude Elferink et al., 2000).

2.7 Ensileringsmidler

For at et tilsetningsstoff skal være hjelpsomt må det øke fôrets næringsverdi, øke dyrets produksjon (ytelse, tilvekst, reproduksjon), eller minske varmgang og muggdannelse under lagring og ved åpning (Kung, 1998). Tilsetningsstoffer blir ofte klassifisert etter hvilken påvirkningsevne de har på fermenteringen. Normalt klassifiseres de i fire kategorier; fermenteringsstimulatorer, fermenteringshemmere, bedret aerob stabilitet og absorbenter og næringsstoffer. Noen midler faller innenfor flere av disse kategoriene (Mo, 2005).

Fermenteringsstimulatorer og fermenteringshemmere vil bli størst vektlagt i denne oppgaven.

2.7.1 Fermenteringsstimulatorer

Fermenteringsstimulatorer er midler som stimulerer fermenteringen. De mest undersøkte midlene i denne kategorien er inokulanter av melkesyrebakterier, enzymer som bryter ned cellevegger og melasse (Mo, 2005). Inokulanter og enzymer er de mest relevante midlene til denne oppgaven, og vil derfor bli tyngst vektlagt.

Hovedpoenget med å tilsette **melkesyre-inokulanter** er å tilføre raskt voksende homofermentative melkesyrebakterier til å dominere fermenteringen og gi en bedre fôr kvalitet (Kung, 1998). Et effektivt ensileringsmiddel med homofermentative melkesyrebakterier vil vanligvis gi raskere fermentering, mer melkesyre og mindre proteolyse, etanol, smør- og eddiksyre, samt mindre tap av energi og TS (Mo, 2005). Raskere fermentering og mer melkesyre skyldes et høyt antall melkesyrebakterier med relativt stor hardførhet allerede tidlig i fermenteringsprosessen. Dette gir en rask pH senkning som inhiberer proteaser, enterobakterier og klostridier, og fører dermed til redusert proteolyse (og deaminering) og redusert innhold av etanol, eddik- og smørsyre.

Melkesyre er ikke et godt middel mot gjærsopp, da soppen vil kunne bruke melkesyren som substrat ved mangel på andre energikilder (Mo, 2005). Uten innblanding av sopphekkende stoffer kan ensileringsmidler kun basert på melkesyre gi framvekst av gjærsopp, og dermed dårlig aerob stabilitet.

Ulike melkesyrebakterier har ulike vekstrater, for eksempel vokser *Streptococcus* > *Pediococcus* > *Lactobacillus*. Selv om *Lactobacillus* vokser tregere har den en bredere optimaltemperatur og pH for vekst (Kung, 1998), som er et viktig kriterium for en god inokulant (Mo, 2005).

Enzymer er proteiner som assisterer i metabolske prosesser. Det finnes mange ulike enzymer, men det er spesielt enzymer som bryter ned fiber og stivelse som blir brukt som tilsetningsstoffer, hvorav de vanligste er cellulase og hemicellulase (Kung, 1998).

Det er to hovedgrunner for å tilsette fiber-nedbrytende enzymer til ensilagen. Den første er at enzymene delvis kan bryte ned cellulose og hemicellulose til fermenterbart sukker som melkesyrebakteriene kan bruke som substrat. Dette vil stimulere fermenteringen og kvaliteten på den ved å øke styrken og lengden av pH nedgangen, øke konsentrasjonen av melkesyre, forbedre melkesyre:eddiksyre ratioen (indikator på økt effektivitet av fermenteringen), og redusere tørrstofftapet. Et raskere pH fall vil også begrense nedbrytning og deaminering av fôrprotein og redusere produksjonen av ammoniakk (Kung, 1998). Den andre grunnen til å benytte slike enzymer er å redusere fiberinnholdet i fôret og øke fordøyeligheten (Mo, 2005). Delvis nedbrytning av celleveggen kan forbedre fordøyeligheten (Kung, 1998). Økt fordøyelighet av fiber skal ifølge McDonald (1981) resultere i økt tørrstoffopptak, økt produksjon av mikrobeprotein i vomma og økt fordøyelighet av organisk stoff.

Det er likevel verdt å bemerke at enzymtilsetninger også vil bedre næringstilgangen til uønskede mikroorganismer. Det er dermed viktig at enzymene er aktive og frigir fermenterbare karbohydrater til melkesyrebakteriene tidlig i ensileringsprosessen. Enzymene må dermed være aktive ved høyere pH og lavere temperaturer enn hva tilfellet er senere i ensileringsprosessen (Mo, 2005).

Melasse er et sukkerholdig tilsetningsmiddel som var mye brukt tidligere. I dag brukes det stort sett i tempererte strøk. Melassen skiller ikke mellom ønskede og uønskede mikroorganismer i fôret, men melkesyrebakteriene profitterer mer på økt sukbertilgang enn andre mikroorganismer. De vokser dermed raskere og vil etter kort tid dominere i fôret (Mo, 2005). Melasse er et effektivt middel til å fremme melkesyregjæring og redusere pH, samt begrense smørsyrefermentering, proteolyse, og tap av organisk stoff (McDonald et al., 1991).

2.7.2 Fermenteringshemmere

Kjemiske ensileringsmidler som gir en delvis eller fullstendig hemming av fermenteringen og/eller den aerobe nedbrytningen blir ofte klassifisert som fermenteringshemmere (Mo, 2005). På det norske markedet i dag baserer fermenteringshemmende midler seg enten på

maursyre eller en blanding av natriumnitritt og hexametylentetramin (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013). Syrebaserte midler affekterer fermenteringen ved å redusere pH i fôret. Dette hemmer aktiviteten til uønskede bakterier, og gir melkesyrebakteriene gode vekstforhold (Mo, 2005).

Maursyre gir vanligvis god fôrkvalitet. Middelet fører til en begrenset fermenteringsintensitet som kan gjøre fôret mer ustabil i kontakt med luft. Maursyre kan i fermenteringshemmende midler enten inngå som eneste konserverende komponent, eller inngå i kombinasjon med andre syrebaserte produkter (Mo, 2005). Moderne produkter er ofte tilsatt natriumformiat for å svekke maursyras korroderende og etsende egenskaper (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013).

Under normale forhold vil ensileringsmidler med maursyre redusere pH og dannelsen av melkesyre, eddiksyre, smørsyre og ammoniakk, samt øke produksjonen av etanol og WSC (Mo, 2005). Maursyre gir også økt cellesprengning (plasmolyse), og øker dermed pressaftavrenningen ved ensilering av fôr med lavt tørrstoffinnhold (Mo, 2005). Den er også lite effektiv til å hemme veksten av gjær- og muggsopp (Henderson et al., 1972).

En blanding av **natriumnitritt og hexametylentetramin** har dannet grunnlaget for de kjente «Kofa-produktene». Under ensileringsprosessen avgir natriumnitritt nitrøse gasser som har en antimikrobiell effekt på fermenteringen til enterobakteriene og bremser framvekst av klostridier tidlig i ensileringsprosessen (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013). Det er kun anbefalt å benytte rundballer ved anvendelse av midler som avgir nitrøse gasser (Randby, 2005) da gassen er giftig for både mennesker og dyr (Norsk Landbruk, 2019).

2.7.3 Bedret aerob stabilitet

Ensileringsmidler som inneholder propionsyre, benzosyre, sorbinsyre og/eller salter av disse bedrer stabiliteten ved å hindre vekst av mugg og gjær som er ansvarlig for aerobisk nedbrytning i grovfôret (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013).

Udissosiert propionsyre har en sopphekkende effekt. Forholdet mellom dissosiert (COO-) og udissosiert (COOH) syre er sterkt avhengig av pH, da andelen udissosiert propionsyre øker med synkende pH (Mo, 2005). Dette betyr at propionsyras sopphekkende effekt øker med synkende pH, og gjør den ideell til å forbedre den aerobiske stabiliteten i grovfôr med lav pH (Kung, 1998).

Propionsyre er ubehagelig å håndtere da den er flyktig, har en ubehagelig lukt og er korroderende. I likhet med maursyre blir den derfor ofte tilsatt i form av salter, hvorav de

vanligste er natriumpropionat, kalsiumpropionat og ammoniumpropionat (Mo, 2005). Hvor effektiv propionsyre og saltene er til å inhibere sopp er sterkt korrelert til løseligheten i vann. Økt styrke i båndet mellom syre-basen reduserer løseligheten i vann, og gir dermed redusert effektivitet. Av saltene er ammoniumpropionat mest løselig i vann (90 %), etterfulgt av natriumpropionat (25 %) og kalsiumpropionat (5 %) (Kung, 1998; Mo, 2005).

Andelen propionsyre som tilsettes varierer ut fra tørrstoffinnholdet, lagringstiden, og de andre tilsatte midlene. For høy dosering gir mye syre som kan hindre fermenteringen (Kung, 1998).

Selv om propionsyre utgjør den største andelen av de aktive ingrediensene i fermenteringshemmere er det i dag vanlig å tilsette andre stoffer som **benzosyre** og **sorbinsyre** for å forbedre den aerobiske stabiliteten. (Kung, 1998). Også disse har udissosierte former med sopphekkende egenskaper. Sorbinsyre er mer effektiv til å hemme vekst av gjær- og muggsopp enn benzosyre (Mo, 2005).

2.8 Ulike kvaliteter

Kvaliteten på surfôret kan måles i tre hovedgrupper: Næringsverdi, gjæringskvalitet og hygienisk kvalitet (Salomonsen, 2006b). Næringsverdien til et fôrmiddel baseres hovedsakelig på energi- og proteinverdi, som har nær sammenheng med fordøyeligheten av fôret (Thuen & Harstad, 2016). Gjæringskvaliteten måles ut fra innholdet av organiske syrer, sukker, ammoniakk-N og alkoholer. Hygienisk kvalitet måles gjennom innholdet av skadelige mikroorganismer, der de mest betydningsfulle er smørsyresporer, mugg- og gjærsopp (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013).

2.8.1 Næringsverdi

Næringsverdien til et surfôr omfatter energi- og proteininnholdet, og er, som beskrevet i avsnitt (2.2 (morfologisk utviklingstrinn)), spesielt avhengig av høstetidspunkt. Et tidlig høstetidspunkt gir økt energi- og proteininnhold i fôret, men kan gi problemer med lav strukturverdi (Mo, 2006). Strukturen er knyttet til fiberinnholdet, og påvirker både vommiljø og fôropptak. Det er først og fremst tyggeaktiviteten som påvirkes. Spytten til drøvtyggere inneholder bufferstoffer som er viktig for å opprettholde et godt **vommiljø**. Reduksjon i tyggeaktiviteten reduserer også spyttproduksjonen og dermed bufferstoffer til vom (Volden, 2010).

Det er nesten umulig å produsere et surfôr som kombinerer et høyt innhold av energi og protein med tilstrekkelig struktur for å sikre et godt vommiljø (Mo, 2005). Alternativt er det

mulig å tilføre en rasjon bestående av tidlig høstet surfôr mer struktur gjennom supplering av strukturreike fôrmidler som høy og halm. Motsatt er det også mulig å supplere seint høstet surfôr med et fôrmiddel med høyt energi- og proteininnhold, som for eksempel kraftfôr.

Fyllegraden i vom er en viktig faktor som i stor grad påvirker **fôropptaket** av grovfôr, og er relatert til faktorer både ved dyret selv og til fôret. For fôr er passasjehastigheten av fôrpartikler ut av vom den viktigste faktoren, og er relatert til fôrets kjemiske sammensetning, partikkelstørrelse, fordøyeshastighet av den fordøyelige fraksjonen og nedbrytningshastigheten av de ufordøyelige partiklene (Mo, 2005). Generelt vil fôr med høy fordøyelighet fordøyas raskere, og ha en raskere nedbrytning av ufordøyelige partikler enn fôr med lav fordøyelighet. Passasjehastigheten til fôret er avhengig av fordøyeligheten da kun små partikler kan passere ut av vom. Fôr med høy fordøyelighet blir raskere brutt ned, og kan raskere passere ut av vom. Dette frigir raskere plass til nytt fôr og gir dermed økt fôropptak.

2.8.2 Gjæringskvalitet

Gjæringskvaliteten på grovfôret sier noe om hvor vellykket ensileringsprosessen har vært, og har betydning for både fôropptak og lagringsstabilitet. God gjæringskvalitet er dermed viktig for å kunne oppnå et godt produksjonsresultat (Eurofins, 2018b). Feilgjæring, eller fermentering som gir surfôr av dårlig kvalitet kan oppstå om pH i grasmassen ikke synker raskt nok, eller det ikke blir dannet tilstrekkelige mengder melkesyre i startfasen til å gi et stabilt surfôr (Eurofins, 2018b; Harstad, 2016; Kung, 1998). Klostridier vil da bruke resten av de lettløselige karbohydratene (og melkesyre) til å produsere smørsyre (Harstad, 2016). Smørsyregjæring gir fôret en sterk ubehagelig lukt og reduserer både smakeligheten og fôropptaket (Kung et al., 2018). Protein brytes blant annet ned til ammoniakk. Feilgjæring kan også domineres av enterobakterier og surfôret får da et høyt innhold av eddiksyre (Harstad, 2016), som reduserer smakeligheten (Kung et al., 2018), og øker pH.

Ettergjæring i fôret kan oppstå om innholdet av melkesyre er lavt, mens for høyt innhold kan redusere fôropptaket. Mye etanol i fôret kan gi fôrsmak på mjølka, og pH-verdier under 4 kan resultere i lite restsukker som reduserer smakeligheten og dermed også fôropptaket (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013).

Gjæringskvaliteten er nært knyttet til andelen TS i fôret da det har stor betydning for innholdet av gjæringsprodukter og sukker (Eurofins, 2018b). I velgjæret surfôr vil innholdet av organiske syrer og ammoniakk synke med økende tørrstoffinnhold, mens andelen sukker vil øke. Grunnen er at ved fortørking omdannes mindre av sukkeret i graset til organiske

syrer, og mindre av proteinet brytes ned til ammoniakk (Tine Rådgivning og Medlem et al., 2013). Dette gjør fôret mer smakelig og fôropptaket øker.

2.8.3 Hygienisk kvalitet

Hygienisk kvalitet vurderes ut fra mengden uønskede bakterier, sporer, mugg- og gjærsopp i fôret som forringer fôrkvaliteten og lagringsstabiliteten. Lav hygienisk kvalitet på grovfôret kan redusere fôropptaket og i mange tilfeller være sykdomsfremkallende (Eurofins, 2018a). Fôrets hygienisk kvalitet påvirker både dyret selv, produktkvaliteten (smørresporer i melk) (Eurofins, 2018a), samt mennesker som håndterer fôret, og spiser produktene fra dyret (Salomonsen, 2006a).

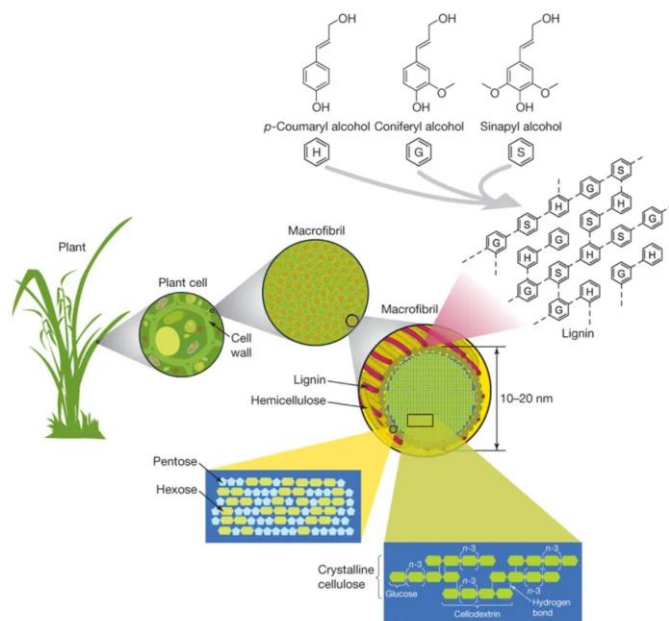
De vanligste mikroorganismene som gir lav hygienisk kvalitet er klostridier, mugg og gjær. Disse finnes naturlig i jord, husdyrgjødsel og /eller dødt plantemateriale (Eurofins, 2018a). Det er derfor viktig å begrense kontaminering fra disse kildene både på gras før høsting og i siloen ved ilegging og ved åpning/utfôring.

Lukt, farge, mugg, sopp og jord er vanlig å bruke som indikatorer på fôrets hygieniske kvalitet. Surfôr av høy hygienisk kvalitet skal ha en frisk og lett syrlig lukt, være fritt for mugg og ha en gul til gulgrønn farge (Salomonsen, 2006a). En mørk farge indikerer høy temperatur under gjæringen som kan gi et høyt innhold av ammoniakk og redusert smakelighet, mens en skarp og stikkende lukt kan tyde på feilgjæring.

2.9 Fiber

Mengden fiber, eller celleveggstoffer i gras øker med økende utviklingsstadier på gras (Eurofins, 2018b). NDF er den totale mengden fiber i fôr og består av cellulose, hemicellulose og lignin (Eurofins, 2018b; Weisbjerg & Hvelplund, 2003). Videre kan NDF fraksjonen deles opp i ADF (acid detergent fiber) som består av lignin og cellulose, og ADL (acid detergent lignin) som kun består av lignin. Denne typen fraksjonering benyttes i van Soest analyse som brukes mye innen drøvtyggerernæring (Weisbjerg & Hvelplund, 2003). NDF-innholdet har betydning for fôrets energiinnhold og AAT-verdi (Eurofins, 2018b).

Cellulose, hemicellulose og lignin er som vist i figur 3 viktige komponenter i plantecelleveggs strukturelle oppbygning.



Figur 3: Plantecelleveggenes oppbygning (Rubin, 2008).

2.9.1 Cellulose

Polysakkaridet cellulose er den vanligste enkeltpolymeren i planteriket, og er hovedbestanddelen av plantens cellevegg. Ren cellulose består av kjeder med glukosemolekyler bundet sammen av β -(1:4) bindinger. I planten holdes cellulosekjedene sammen av både inter- og intramolekylære hydrogenbindinger (McDonald et al., 2011). Cellulose kan brytes ned til mindre komponenter av enzymet cellulase (Kung, 1998).

2.9.2 Hemicellulose

Hemicellulose er definert som alkali-løselig cellevegg polysakkarid som er nært assosiert med cellulose. Strukturelt består hemicellulose hovedsakelig av D-glukose, D-galaktose, D-mannose, D-xylose og L-arbinose bundet sammen i ulike kombinasjoner av ulike glukosidbindinger. Hemicellulose i gras inneholder hovedsakelig en hovedkjede av xylan laget av D-xylose bundet sammen med β -(1:4) bindinger med forgreininger som inneholder metylglukuronsyre og ofte glukose, galaktose og arabinose (McDonald et al., 2011). Hemicellulase er et enzym som kan bryte ned hemicellulose til mindre komponenter (Kung, 1998).

2.9.3 Lignin

Lignin er regnet som limet eller sementen i celleveggen da det styrker og stiver av celleveggen og gjør planten mer stabil. Ligninet beskytter også planten mot abiotisk og biotisk stress som patogener og insekter (Frei, 2013).

Lignin er ikke et karbohydrat, men et komplekst aromatisk polymer som finnes i celleveggen til alle karplanter (Frei, 2013). Det blir likevel betegnet som et celleveggstoff da det binder seg til hemicellulose. I seg selv har ikke lignin noen næringsmessig verdi, men det er av interesse da et høyt innhold av lignin indikerer lav tilgjengelighet av de andre celleveggfraksjonene (Weisbjerg & Hvelplund, 2003). Som nevnt i avsnitt (2.2 (morfologisk utviklingsstadium) vil andelen lignin øke i takt med plantes utviklingstrinn, og økt lignifisering vil redusere fordøyelighet av NDF. Lignin er vanskelig å bryte ned, selv gjennom mikrobiell fermentering (Frei, 2013).

2.10 Ulike metoder for å bestemme vomfordøyelighet

Vomfordøyelighet kan bestemmes ved ulike metoder. Biologiske metoder for bestemmelse av vomfordøyelighet innebærer nedbrytning av fôrprøver i vomma på levende dyr (*in vivo* og *in situ*). Laboratoriske metoder (*in vitro*) krever derimot ikke bruk av dyr, og skaper i stedet en simulert fordøyelse som etterligner både vommiljø og vomnedbrytning (Cattani, 2011).

2.10.1 *In vivo* vomfordøyelighet

In vivo (i levende dyr) fordøyelighet estimerer hvor mye av næringsstoffene som fordøyes fra fôret spises til gjødsel utskilles. Fordøyeligheten beregnes ut fra forholdet av næringsstoffer i fôr og gjødsel. Ulike metoder kan benyttes for bestemmelse av *in vivo* fordøyelighet, deriblant totaloppsamling av gjødsel og bruk av ufordøyelige markører (Weisbjerg & Hvelplund, 2003). Totaloppsamling av gjødsel er av disse den sikreste metoden, men også den dyreste og mest arbeids- og tidkrevende metoden å gjennomføre (Huhtanen et al., 1994; Stern et al., 1997).

2.10.2 *In situ* vomfordøyelighet

In situ eller nylonposeteknikken (*in sacco*) er en metode for å direkte måle vomnedbrytningen av ulike fôrmidler på. Metoden går ut på å plassere en gitt mengde fôr i en ikke-nedbrytbar pose med porestørrelse på 30-50 µm i vomma, og måle hvor mye som forsvinner av ulike fôrkomponenter etter inkubering (Noziere & Michalet-Doreau, 2000). Ulike inkuberingstidspunkter benyttes ofte for å kunne se hvor mye som brytes ned ved ulike tidspunkter, samt lage en nedbrytningskurve som viser nedbrytningsmønsteret i vom for ulike fôrmidler og deres næringsstoffer. Tidspunktene som benyttes kan variere ut fra fôrmiddel, men ofte brukte tidspunkter er 0t, 2t, 4t, 8t, 16t, 24t, 48t, 72t og 96t. I tillegg kan 288t benyttes for bestemmelse av ufordøyelig NDF (iNDF) (Volden, 2011).

2.10.3 *In vitro* vomfordøyelighet

In vitro betyr i glass, og er en simulert fordøyelse. Prosessen foregår altså utenfor organismen (Kåss, 2019). Det finnes flere ulike *in vitro* metoder som kan benyttes for å beregne vomfordøyelighet. Noen av disse metodene er Tilley og Terry metoden, måling av gassproduksjon og ANKOM Daisy II.

Tilley og Terry metoden er en to-steps metode for bestemmelse av TS-fordøyelighet, og innebærer først 48t inkubering i en buffervomvæske etterfulgt av 48t inkubering i pepsin-saltsyre (Tilley & Terry, 2006; Weisbjerg & Hvelplund, 2003). Metoden blir påvirket av flere faktorer som mengde vomvæske i forhold til bufferløsning, type buffer, prøvens partikkelstørrelse, dietten til donordyret og tidspunkt for henting av vomvæske (Stern et al., 1997).

Måling av **gassproduksjonen** til et fôrmiddel kan brukes til å finne raten og omfanget av fordøyeligheten til fôrmiddelet på da vommikrober vil bryte ned karbohydrater til flyktige fettsyrer (VFA), CO₂, CH₄ og H₂ under anaerobiske forhold (Stern et al., 1997). Metoden baserer seg på at fôrprøven inkuberes i en liten lukket beholder tilsatt bufferløsning og vomvæske, men i stedet for å måle de ufordøyde restene måles gassproduksjonen (Weisbjerg & Hvelplund, 2003). I denne oppgaven ble «ANKOM Gas Production System» benyttet. Systemet måler automatisk mikrobiell fermentering gjennom konstant overvåking av gasstrykk og temperatur i opptil 50 individuelle moduler av gangen (Ankom Technology, 2018).

Ankom Daisy II er en inkubator som enkelt og nøyaktig analyserer opp til 100 prøver for total eller delvis fordøyelse. Prøvene blir fordelt mellom fire fordøyelses-glass som gjør det enklere å opprettholde anaerobe forhold sammenlignet med andre inkuberingsmetoder der hver prøve inkuberes i individuelle testrør. Daisy inkubatoren kan utføre fordøyelsesstudier enten ved å benytte enzymer eller vomvæske (Ankom Technology, 2017b). Ved bruk av vomvæske kreves det tilgang på vomfistulerte dyr (Weisbjerg & Hvelplund, 2003). Under inkuberingen vil Daisy holde prøvene på en stabil temperatur på 39,5 °C, og konstant bevege på prøvene ved å rotere glassene (Ankom Technology, 2017b).

3. Material og metode

3.1 Pakking

Den 29.10.2019 ble en batch vått gras (TS = 14,58 %) høstet, kuttet og blandet til en homogen grasmasse. En del ble tatt ut og tørket over natten til 36 % TS. Graset ble veid opp i individuelle poser. Behandling 1-9 ble veid opp med ca 750 g grasmasse, 10-27 med ca 500 g grasmasse og 28-36 med ca 250 g grasmasse. Ensileringsmidler og enzymer ble tilsatt etter produsentenes anbefalte mengder, og fordelt jevnt i den respektive prøven. Posene ble så vakuumpakket (figur 4) før de ble satt til lagring ved ca 18-22,5 °C fram til åpning i januar. Prøver av graset før ensilering sendes til analyse.



Figur 4: Vakuumpakking. Foto: Thea Brustad

Tabell 2 viser en oversikt over behandlingene uten enzymer, hvor behandling 1-9 er utført på det direkte kuttete graset og behandling 28-36 er utført på fortørka gras. Tabell 3 viser en oversikt over behandlingene (10-27) som inneholdt enzymer.

Tabell 2: Oversikt over behandling 1-9 (lavt TS) (og 28-36 (Høyt TS) ved bruk av ulike ensileringsmidler.

Nr.	Ensilerings- middel	Virkestoffer	Dosering (l/tonn)		Beregnet for	Antall poser	Referanse
			Anbefalt	Tilsatt			
1 (28)	Uten tilsetning					2	
2 (29)	Maursyre 85%	84-85 % maursyre (E236)	3	3	Direkte høsta gras	2	(Norgesfôr, u.å.-f)
3 (30)	GrasAAT Lacto	57-67 % maursyre (E236) 14-18 % natriumformiat 1-2 % laktose	3-5	4	Direkte høsta gras	2	(Norgesfôr, u.å.-a)
4 (31)	GrasAAT Plus	40-48 % maursyre (E236) 17-23 % natriumformiat 10-14 % propionsyre 1-2 % benzosyre 0,5-1,5 % glyserol	3-5	4	Opptil 45 % TS	2	(Norgesfôr, u.å.-b)
5 (32)	GrasAAT SX	34-40 % maursyre (E236) 20-24 % natriumformiat 16-20 % propionsyre 0,5-1,5 % sorbinsyre	3-5	4	Opptil 55 % TS	2	(Norgesfôr, u.å.-c)

6 (33)	Kofasil LP	18-20 % natriumnitritt (E250) 13-15 % hexametylenretramin 4-6 % natriumbenzoat	2.0 - 3.5	3	15-35 % TS	2	(Norgesfôr, u.å.-d)
7 (34)	Kofasil Ultra	11-15 % natriumbenzoat (E211) 9-12 % natriumnitritt (E250) 6-8 % hexamatylenetetramin 3-5 % natriumpropionat (E281)	3.5 - 4.5	4	Opptil 65 % TS	2	(Norgesfôr, u.å.-e)
8 (35)	Xtrasil Bio Lp	Lactobacillus planetarium Lactobacillus paracase	1-4 ¹	3 ²	Opptil 30-40 % TS	2	(Felleskjøpet, 2014)
9 (36)	Xtrasil Bio Lp			6	Opptil 30-40 % TS	2	

¹Avhengig av blandingsforhold

²Anbefalt mengde i forhold til blandingsforhold

Tabell 3: Oversikt over behandling 10-27 (ensileringsmidler og enzymer). H = hemicellulose, C = cellulose, X = xylanase, P = pektinase

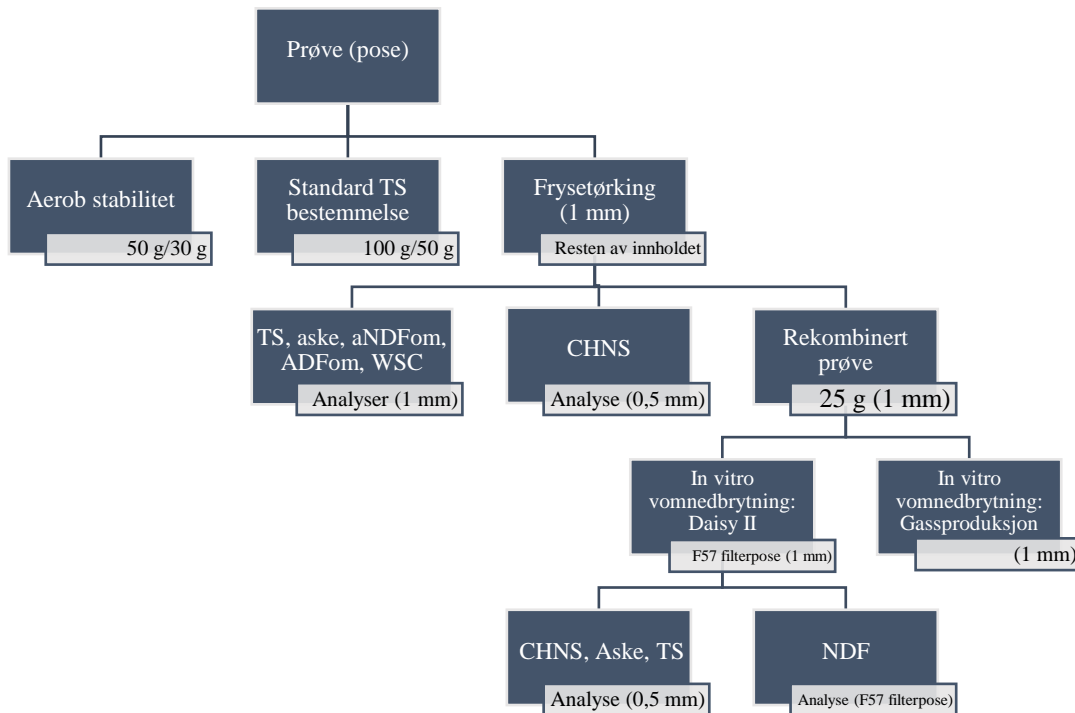
Nr.	Ensileringsmiddel, dosering (l/t)	Enzymer	Dosering enzymer enheter/kg gras	Antall poser
10	Uten tilsetning	H	5000 U	2
11	Uten tilsetning	H	10 000 U	2
12	Uten tilsetning	H + C	5000 U/5000 U	2
13	Uten tilsetning	H + X	5000 U/5000 U	2
14	Uten tilsetning	H + P	5000 U/5000 U	2
15	Uten tilsetning	H + C + X + P	5000 U av alle 4	1
16	Maursyre 85%,	H	5000 U	2
17	Maursyre 85%,	H	10 000 U	2
18	Maursyre 85%	H + C	5000 U/5000 U	2
19	Maursyre 85%	H + X	5000 U/5000 U	2
20	Maursyre 85%	H + P	5000 U/5000 U	2
21	Maursyre 85%	H + C + X + P	5000 U av alle 4	1
22	Xtrasil Bio Lp, 3	H	5000 U	2
23	Xtrasil Bio Lp, 3	H	10 000 U	2
24	Xtrasil Bio Lp, 3	H + C	5000 U/5000 U	2
25	Xtrasil Bio Lp, 3	H + X	5000 U/5000 U	2
26	Xtrasil Bio Lp, 3	H + P	5000 U/5000 U	2
27	Xtrasil Bio Lp, 3	H + C + X + P	5000 U x 4	1

3.2 Åpning

Åpningen av posene ble foretatt 13. og 14. januar 2020 (2,5 måneder etter pakking). Før åpning av posene ble vekten registrert, og en gassprøve på 20 ml ble tatt ut. Posen ble så åpnet og veid uten gass. pH ble så målt ved å lese av et elektronisk pH-meter plassert i en blanding av 10 g prøve (3 g for prøvene med høyt TS) og 10 ml destillert vann i 5 min.

Hver pose ble så delt inn i fire ulike prøver til ulike analyser, en til aerobisk stabilitet (Lagt TS 50 g/høyt TS 30 g), en til frysing (Lagt TS 50 g/høyt TS 40 g), en standard TS bestemmelse

(1A-9B 100 g/10A-36B 50 g), og en til frysetørking (1A-9B 390 g/10A-36B resten av innholdet). Figur 5 viser en oversikt over ulike prøver og tilhørende analyser.



Figur 5: Inndeling av grasmassen til ulike prøver og tilhørende analyser.

3.3 Aerobisk stabilitet

Retten etter åpning av posene ble en prøve fra hver pose veid ut og plassert i et tilsynelatende varmestabilt rom (18-22,5 °C) i 14 dager. Temperaturen i hver enkelt prøve ble daglig målt og registrert på eget skjema. Muggdannelse i prøvene ble også fortløpende registrert i eget skjema.

3.4 Standard TS bestemmelse

Prøvene ble veid opp før de ble tørket i tørkeskap på 60°C i 48 timer. Veid direkte ut av tørkeskap og etter 24 timer ekvilibrerings på benk.

3.5 Frysetørking

Prøvene ble frysetørket og malt til 1 mm og 0,5 mm for videre bruk og analyser.

Fra hver behandling ble det laget en rekombinerte prøve på 25 g (12,5 g fra A + 12,5 g fra B), som ble benyttet som prøvemateriale til bestemmelse av *in vitro* vomnedbrytning.

3.5.1 *In vitro* vomnedbrytning: Daisy II inkubator

Til *in vitro* behandlingen ble det benyttet en «Ankom Daisy II incubator» som er nærmere beskrevet i avsnitt (2.10.3). Inkubatoren rommer opptil fire fordøyelses-glass som hver kan romme opptil 25 filterposer av typen F57. Inkuberingstidspunktene i dette forsøket er 0, 12, 24, 48 og 96 timer.

Filterposene for-renses i aceton i tre til fem minutter før de lufttørkes. Dette gjøres for å fjerne et belegg som hindrer mikrobiell nedbrytning (Ankom Technology, 2005). Videre merkes posene før de individuelt veies. 1 g prøve blir veid inn i hver pose før de forsegles.

For hver av de 38 prøvene ble det veid inn 10 poser, 2 til 0 timer, 2 til 12 timer, 2 til 24 timer, 2 til 48 timer og 2 til 96 timer (til sammen 380 poser). I tillegg ble det veid inn 40 poser med standardfôr, og 20 blanke poser (uten fôr). 25 poser ble så plassert i hvert fordøyelses-glass: To poser med standardfôr, en blank pose og 22 poser av 11 ulike prøver av samme tidspunkt (12, 24, 48 eller 96 timer). Alle poser med samme tidspunkt ble inkubert samtidig. Til sammen fire separate inkuberinger, en 12t, en 24t, en 48t og en 96t.

Bufferløsninger (A og B) ble laget etter anvisninger fra Ankom Technology (2005), og er oppgitt i vedlegg 1. Begge bufferløsninger ble forvarmet til 39°C før ca. 266 ml av løsning B og 1330 ml av løsning A ble blandet i en egen beholder for hvert av fordøyelses-glassene. Nøyaktig mengde av A og B justeres for å oppnå pH 6,8 ved 39°C. Omtrent 1600 ml av den kombinerte bufferløsningen tilsettes i hvert av fordøyelses-glassene (Ankom Technology, 2005), før de blir plassert i en forvarmet Daisy II inkubator i 20-30 min.

To 2L termosier blir så forvarmet ved å fylle dem med lunkent vann (39°C). Vannet helles ut rett før de fylles med vomsaft fra 2-3 fistulerte kuer føret med standardfôr. Vomsaften fra begge termosene filtreres gjennom et filter (200µm; SEFAR NITEX, Sefar AG, Heiden, Switzerland) ned i en forvarmet beholder (39°C) (Ankom Technology, 2005). Oksygen fjernes fra beholderen med vomsaft ved å tilføre CO₂.

Ta ut et fordøyelses-glass fra inkubatoren og tilsett 400 ml filtrert vomsaft. Fjern oksygenet i glasset ved å dusje innholdet i CO₂-gass i 30 sekunder før lokket raskt skrues på igjen og glasset plasseres tilbake i inkubatoren. Repeter prosessen for de resterende glassene som skal brukes (Ankom Technology, 2005).

Etter inkubering vaskes posene med kaldt vann i vaskemaskin (samme som *in sacco* poser) før tørking i tørkeskap på 45°C i 48 timer. Ekvilibrert vekt registreres 24 timer etter at prøvene er tørket.

3.5.2 *In vitro* vomnedbrytning; ANKOM Gassproduksjonssystem

ANKOM Gas Production system ble benyttet for å registrere gassproduksjonen i prøvene. Til sammen ble det kjørt tre batcher av 42 prøver, som hver inneholdt to blanke prøver, to prøver med standardfôr og 38 fôrprøver. Alle fôrprøvene hadde 3 replikater, og hver batch ble inkubert i 72 timer.

Grunnet forsinkelser og komplikasjoner i forbindelse med Covid-19 ble det kjørt færre replikater av hver prøve enn planlagt. De resterende to replikatene for hvert fôr vil bli kjørt på et senere tidspunkt.

Dagen før hver inkubering ble bufferløsning, mikromineral-løsning, makromineral-løsning og resaruzin klargjort etter instruksjoner fra Ankom Technology (2018). Oppskrift på hver av løsningene er oppgitt i vedlegg 2. I tillegg ble 1 gram prøve ble veid inn i hver av de 42 flaskene (200 ml) som skulle benyttes, med unntak av de to blanke prøvene.

På inkuberingsstart-dagen ble reduserende løsning (vedlegg 2) blandet etter instruksjoner fra (Ankom Technology, 2018), og ferdig bufferløsning ble laget ved å blande 1750 ml destillert vann med 875 ml makromineral-løsning, 875 ml bufferløsning, 0,44 ml mikromineral-løsning og 4,38 ml resazurin løsning. Blandingen ble så kontinuerlig tilført CO₂ i 2 timer før 183 ml reduserende løsning ble tilsatt. Under kraftig omrøring i 20-30 min vil fargen på den ferdige bufferløsningen forandre seg fra lilla til rosa til blank (figur 6). Cirka 66 ml bufferløsning ble så tilsatt i hver av flaskene. Flasker med prøve og bufferløsning ble plassert i tørkeskap på 39 °C i 20-30 min.



Figur 6: Fargeendring på bufferløsning under omrøring. Foto: Thea Brustad

Cirka 2 L vomvæske ble hentet fra 3 ulike dyr. Denne ble filtrert før 33 ml ble tilsatt i hver flaske med prøve og bufferløsning. En gassmålingsmodul ble så raskt skrudd fast på toppen av hver flaske før de ble plassert på et vippebrett i tørkeskap på 39 °C i 72 timer (figur 7). Gassmålingsmodulen måler og registrerer gasstrykk og temperatur i hver enkelt prøve hvert 10 min under hele inkuberingen. I tillegg har den en ventil som slipper ut gass og reduserer trykket i flasken dersom det overstiger en angitt psi verdi. Vippebrettet gjør at flaskene er under konstant bevegelse under hele inkuberingen.



Figur 7: Inkubering av 21 ferdigstilte prøver med gassmålingsmoduler på vippebrett. Foto: Thea Brustad

Etter inkuberingen ble pH målt i hver enkelt prøve før restene ble samlet opp i nylonposer (porestørrelse 16µm) og vasket med kaldt vann i vaskemaskin (samme som *in sacco* poser). Etter vask ble prøvene tørket i tørkeskap på 45 °C i 48 timer.

3.6 Kjemiske analyser

Alle kjemiske analyser ble utført av LabTek ved institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap (IHA), NMBU, Ås. Oversikt over prøvemateriale og analyser er vist i figur 5.

Begge utgangsmaterialer og det ferdig ensilerte graset ble analysert for TS, CHNS, NDF, ADF, aske og WSC. Prøvene fra ANKOM Daisy II ble analysert for CHNS, NDF, TS og aske.

Benyttede analysemetoder:

- Tørrestoffinnholdet ble funnet ved å tørke prøven på 103 °C ± 2 °C i tørkeovn til stabil vekt oppnås, minimum fire timer (International Organization for Standardization, 1999) (60 °C natten over for surfôr).
- Aske analyseres ved forbrenning i forskningsovn, Nabertherm, på 550 °C i minimum 4 timer (International Organization for Standardization, 2002).
- NDF ble analysert ved hjelp av Ankom²⁰⁰ Fiber Analyzer (Ankom Technology Macedon, NY, USA) (Ankom Technology, 2017c), etter (Mertens, 2002) ved bruk av natriumsulfitt og α -amylase og korrigert for aske (aNDFom).
- ADF bestemmes ved hjelp av Ankom²⁰⁰ Fiber Analyzer (Ankom Technology Macedon, NY, USA) (Ankom Technology, 2017a), etterfulgt av en forskning etter standard fra International Organization for Standardization (2002) uten forkulling for bestemmelse av ADFom (askekorrigert ADF).

- CHNS (Dumas/total-N) analyseres etter International Organization for Standardization (2008) ved hjelp av Vario El Cube elementanalysator (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany).
 - Råprotein ble kalkulert ved å multiplisere prøvens innhold med 6,25.
- WSC ble analysert etter prosedyre beskrevet i Randby et al. (2010).

3.7 Beregninger

3.7.1 Ankom Daisy: *In vitro* sann fordøyelighet (IVTD)

$$\% \text{ IVTD (prøve basis)} = \frac{100 - (W_3 - (W_1 \times C_1))}{W_2} \times 100$$

$$\% \text{ IVTD (TS basis)} = \frac{100 - (W_3 - (W_1 \times C_1))}{(W_2 \times TS)} \times 100$$

Hvor: W_1 = Posevekt (tara)

W_2 = Vekt av prøve

W_3 = Posevekt etter *in vitro* vomnedbrytning

C_1 = Blank pose korreksjon (ovnstørket vekt/original blank pose vekt)

Beregnet IVTD % (TS basis) for alle inkuberingstidspunkter for hver behandling er oppgitt i tabell 5 (vedlegg 4).

3.7.2 Ankom Daisy: Nedbrutt NDF

$$\text{NDF nedbrutt (\%)} = \frac{(\text{NDF i posen før inkubering} - \text{NDF i posen etter inkubering})}{\text{NDF i posen før inkubering}}$$

Andel nedbrutt NDF (%) for hver behandling er oppgitt i tabell 5 (vedlegg 4).

3.7.3 Ankom gassproduksjonssystem: Konvertering av trykk til gassproduksjon

$$n = p(V/RT)$$

Hvor: n = Gass produsert (mol)

p = Trykk (kPa)

V = «head-space» volum i glassflasken (L)

T = Temperatur (K)

R = Gass konstant (8,314472 L*kPa*K⁻¹*mol⁻¹)

$$\text{Gass produsert i ml} = n \times 22,4 \times 1000$$

3.7.4 Ankom gassproduksjonssystem: Beregning av estimert kurve

Modell etter Groot et al. (1996) med en fase ble brukt til å beregne gassproduksjonsparametere. A, B og C parametere er beregnet med Proc nlin i SAS 9.4 og er oppgitt i tabell 6 (vedlegg 5).

$$GP = \frac{A}{1 + \frac{B^c}{t^c}}$$

Hvor: t = tid etter inkubering

GP = gassproduksjon (ml g⁻¹ TS) ved tid t

A = (ml g⁻¹ TS) asymptotisk gass produksjon

B = er tid etter inkubering halvparten av asymptotisk gass har blitt produsert (i timer)

C = en konstant som bestemmer skarpheten av endringen i profilkarakteristikk

3.7.5 Ankom gassproduksjonssystem: Beregning av % TS nedbrutt

$$TS \text{ nedbrutt (\%)} = \frac{100 * (\text{innveid TS} - \text{TS forsvunnet})}{\text{TS innveid}}$$

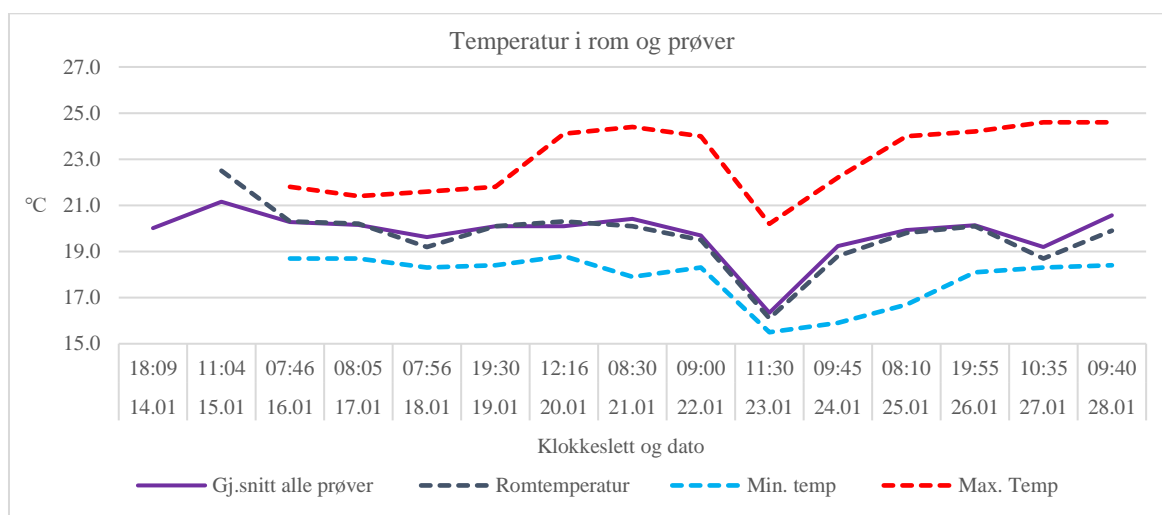
3.8 Statistikk

Perarson correlation coefficients (r) var kalkulert med PROC CORR funksjonen i SAS 9.4 for å sammenligne gjennomsnittsverdiene mellom kjemisk innhold (aske, NDF, ADF, råprotein, WSC, NFCee) og *in vitro* data (gassproduksjon og TS-fordøyelighet (gassproduksjonsmetoden og Ankom Daisy)) for hver behandling. Resultatene er presentert i tabell 7 (vedlegg 6). p-verdier under 0.05 viser at det er en signifikant forskjell mellom ulike behandlinger og er markert med rød skrift i tabellen.

4. Resultater

4.1 Aerob stabilitet

Graset ble veid inn i plastkopper med lokk, og satt på et (tilsynelatende) varmestabilt rom. Lokkene hadde en åpning på ca 1x1 cm for å slippe inn luft. Romtemperaturen og gjennomsnittlig temperaturutvikling i prøvene for hele måleperioden (14 dager) er vist i figur 8.



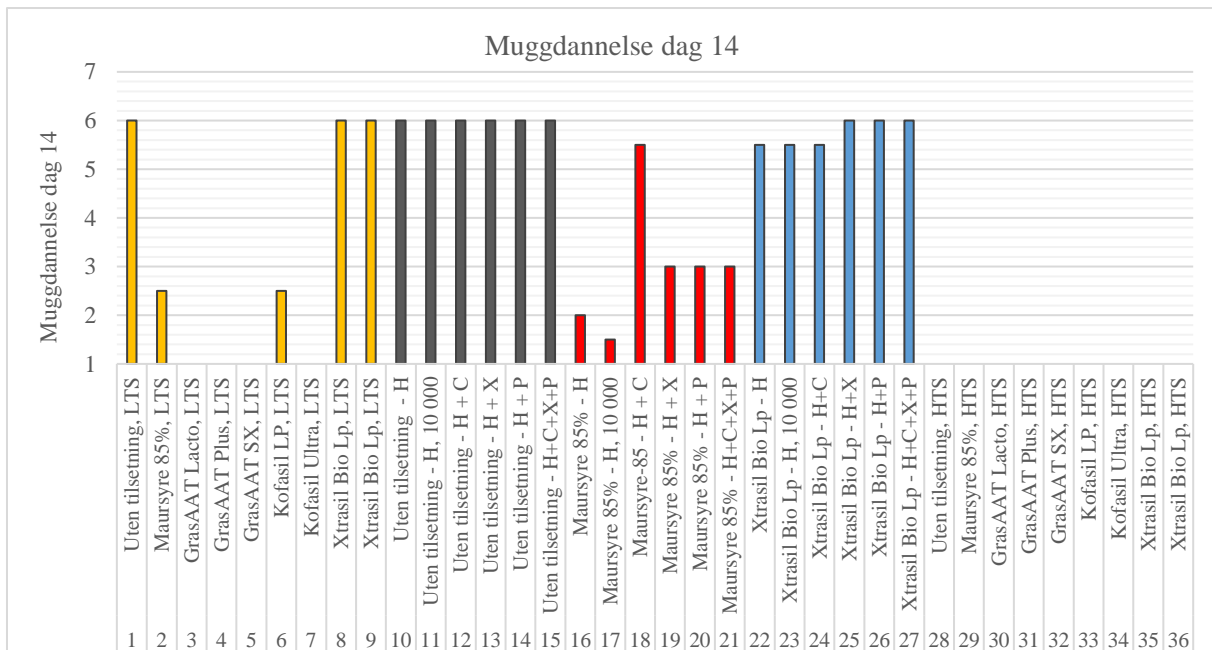
Figur 8: Temperaturutvikling i prøvene og romtemperatur i måleperioden

Muggdannelsen i prøvene ble på dag 14 vurdert på en skala fra 1-6 figur 9 der 1:ingenting, 2:svært lite, 3:lite, 4:middels, 5:mye og 6:svært mye. Figur 10 viser gjennomsnittlig muggdannelse etter 14 dager for hvert ledd, og figur 11 viser antall dager før det ble registrert muggdannelse i første parallell av hvert ledd.

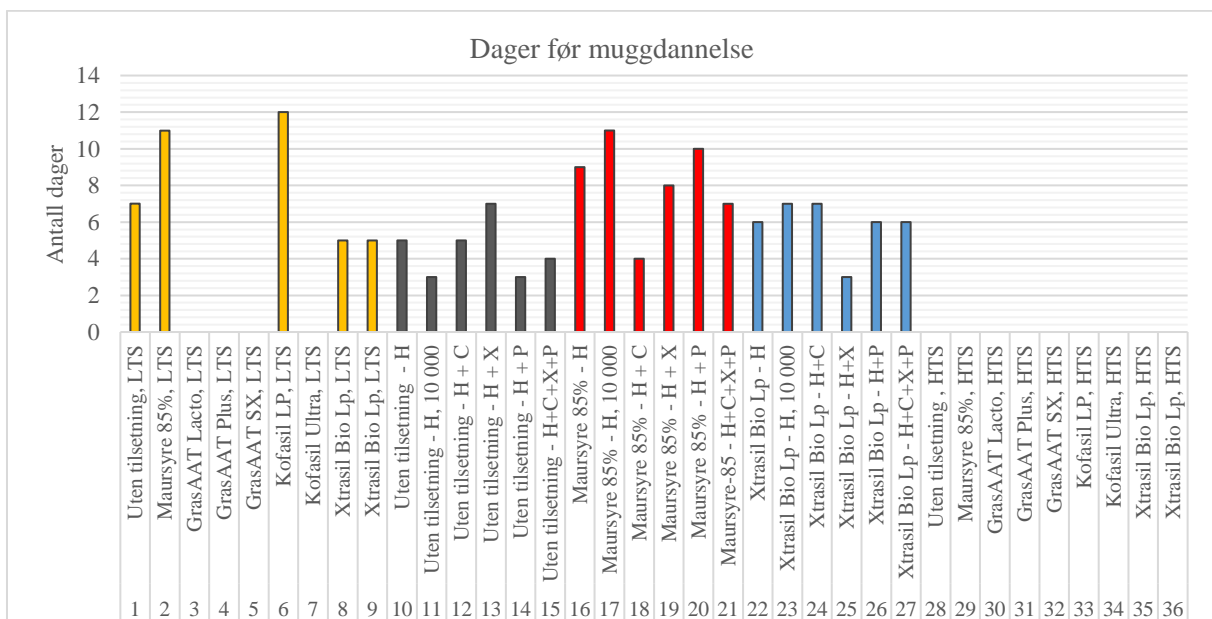


Figur 9: Skala for muggdannelse. 1: ingenting, 2: svært lite, 3: lite, 4: middels, 5: mye og 6: svært mye. Foto: Thea Brustad

Ingen av prøvene tilsatt GrasAAT Lacto, GrasAAT Plus, GrasAAT SX eller Kofasil ultra viste tegn til muggdannelse gjennom hele måleperioden. Prøvene uten tilsetning og med Xtrasil Bio Lp hadde dårligst stabilitet, og utviklet raskest muggvekst både med og uten enzymer.



Figur 10: Gjennomsnittlig muggdannelse dag 14 for begge paralleller. 1 betyr ingen muggdannelse



Figur 11: Dager før muggdannelse i første parallell. 0 betyr ingen muggdannelse.

4.2 Kjemisk innhold

Kjemisk sammensetning for vått og fortørket gras før ensilering og alle behandlinger etter ensilering er vist i tabell 4. I utgangsmaterialet (grasprøvene som ikke ble ensilert) er innholdet av WSC høyere enn alle surførene; 183 og 119 g/kg TS i henholdsvis vått og fortørket gras. Nedgangen i WSC etter tørking gjenspeiles i omtrent lik økning i NDF-fraksjonen (fra 458 til 525 g/kg TS). Det er også til dels stor variasjon i innhold av råprotein mellom vått og fortørket grasprøve (henholdsvis 156 og 173 g/kg TS).

Tabell 4: Gjennomsnittlige næringsverdier for hvert ledd etter ensilering og utgangsmaterialet før ensilering (gras).

	Nr.	Tørrstoff %	pH	Aske g/kg TS	NDF g/kg TS	aNDFom g/kg TS	ADF g/kg TS	ADFom g/kg TS	Råprotein g/kg TS	WSC g/kg TS
Ensileringsmiddel	1	15.24	3.856	98.76	502.73	491.84	294.76	283.88	193.08	4.71
	2	15.86	3.652	94.92	511.41	500.47	287.42	276.47	184.73	22.86
	3	15.70	3.766	97.76	480.56	470.20	280.28	269.91	182.69	27.76
	4	16.38	3.848	97.57	489.28	477.59	278.46	266.77	186.66	37.64
	5	16.21	3.930	97.91	485.25	474.39	282.66	271.80	182.82	26.15
	6	16.11	3.878	97.61	484.06	473.94	279.97	269.85	199.91	19.60
	7	16.07	4.075	97.97	493.34	482.60	284.62	273.89	198.84	10.70
	8	15.00	3.857	99.40	496.56	486.30	294.81	284.55	195.91	5.16
	9	15.05	3.856	97.47	495.16	484.98	290.51	280.34	195.68	6.20
Gjennomsnitt	15.74	3.857	97.71	493.15	482.48	285.94	275.27	191.15	17.87	
Uten ensileringsmiddel, med enzymer	10	14.68	3.840	99.33	494.93	486.35	289.31	280.73	193.06	5.72
	11	14.89	3.849	98.57	496.58	487.02	293.48	283.92	190.93	5.14
	12	15.71	3.786	99.98	438.62	428.69	256.83	246.89	198.97	5.47
	13	15.11	3.774	99.68	489.91	480.07	287.35	277.51	192.28	4.83
	14	15.10	3.805	100.11	483.77	474.16	284.44	274.83	197.36	3.99
	15	14.57	3.726	100.04	435.64	425.27	259.35	248.97	196.05	5.81
Gjennomsnitt	15.01	3.796	99.62	473.24	463.59	278.46	268.81	194.77	5.16	
Maurusyre 85 %, med enzymer	16	15.00	3.804	95.50	475.54	465.63	276.70	266.80	182.73	40.68
	17	14.98	3.781	92.89	497.08	485.10	271.05	259.07	174.69	70.71
	18	15.48	3.732	99.46	432.94	423.32	254.24	244.62	185.22	31.19
	19	15.70	3.719	95.94	472.43	462.24	277.02	266.82	181.91	18.94
	20	14.75	3.731	95.90	474.01	462.84	274.22	263.05	183.19	42.14
	21	14.60	3.673	99.03	429.93	418.98	251.59	240.64	189.08	32.24
Gjennomsnitt	15.09	3.740	96.45	463.66	453.02	267.47	256.83	182.81	39.32	
Xtrasil Bio Lp, med enzymer	22	15.02	3.846	99.07	512.93	501.24	293.78	282.09	187.33	5.15
	23	15.17	3.836	97.96	505.63	493.90	289.05	277.32	193.06	5.01
	24	14.62	3.756	100.04	460.61	448.73	262.68	250.80	192.91	6.37
	25	14.82	3.789	99.39	484.74	473.30	285.84	274.40	189.53	5.31
	26	14.94	3.799	100.94	488.83	477.75	284.53	273.45	190.89	5.02
	27	15.48	3.701	101.29	425.55	413.50	249.13	237.08	197.40	6.62
Gjennomsnitt	15.01	3.788	99.78	479.71	468.07	277.50	265.86	191.85	5.58	
Fortørket, ensileringsmiddel	28	35.65	4.152	95.86	541.27	528.67	297.83	285.23	188.16	4.63
	29	37.35	4.121	95.54	526.89	515.34	287.69	276.14	185.04	13.14
	30	39.46	4.143	96.93	515.39	503.67	280.04	268.32	183.20	24.42
	31	37.71	4.156	96.85	511.91	502.80	279.28	270.17	182.56	10.50
	32	36.18	4.116	95.10	536.24	524.93	288.05	276.73	180.48	6.81
	33	36.90	4.349	97.29	507.98	498.24	280.80	271.06	188.39	6.92
	34	37.82	4.153	97.60	516.56	505.83	278.84	268.11	187.05	8.07
	35	37.12	4.205	98.06	538.21	527.04	291.66	280.50	188.74	4.09
	36	36.19	4.193	96.12	519.85	510.18	289.04	279.38	182.92	4.82
Gjennomsnitt	37.16	4.176	96.59	523.81	512.97	285.91	275.07	185.17	9.27	
Gras	37	14.58	-	82.66	457.53	446.61	251.93	241.01	156.18	183.39
	38	36.00	-	87.94	524.90	513.46	263.96	252.52	172.66	119.14

4.2.1 Effekt av ulike ensileringsmidler på kjemisk innhold

Av prøvene uten enzymer hadde de behandlet med maursyreholdig ensileringsmiddel (Maursyre 85 %, GrassAAT Lacto, GrasAAT Plus, GrasAAT SX) generelt mer WSC (gj.snitt 21,2 g/kg TS) enn prøver behandlet med ensileringsmidler uten maursyre (gj.snitt 7,5 g/kg TS). Maursyreholdige ensileringsmidler resulterte også i lavere pH og et noe lavere innhold av råprotein. Størst variasjon i kjemisk innhold i de ensilerte prøvene finnes i mengden WSC hvor nr 14 (Uten tilsetning H+P) er lavest med 4,0 g/kg TS, og nr. 17 (Maursyre 85% H, 10 000) er størst med 70,7 g/kg TS.

4.2.2 Effekt av ulike enzymer på kjemisk innhold

Alle enzymbehandlinger Uten tilsetning og med Xtrasil Bio Lp har lavere pH enn kontrollen, mens alle enzymbehandlinger med Maursyre 85 % har høyere pH enn kontrollen. Av enzymbehandlingene har H+C+X+P lavest pH for alle tre ensileringsmidler.

Enzymbehandlingene med Maursyre 85% har et høyere innhold av WSC, lavere innhold av aNDFom (med unntak av prøve nr. 27) og lavere pH sammenlignet med tilsvarende enzymbehandling behandlet med Xtrasil Bio Lp og Uten tilsetning.

Alle prøver med H+C og H+C+X+P har høyere andel WSC enn kontroll uten enzym(er), samt lave NDF og ADF verdier. Ensilering med alle enzymene tilstede (H+C+X+P) resulterte i surfôr med lavere NDF innhold (gjennomsnitt = 430 g/kg TS) enn ensilering med hemicellulase og cellulase (H+C). Det er også en nedgang i mengden NDF og aNDFom sammenlignet med kontroll uten enzymer for alle prøver unntatt nr. 22 og 23 (Xtrasil Bio Lp sammen med hemicellulose).

4.2.3 Effekt av fortørking på kjemisk innhold

Fortørkede prøver hadde gjennomsnittlig 21,4 % høyere TS, 0,3 høyere pH, 30,7 g/kg TS mer NDF og 30,5 g/kg TS mer aNDFom enn de våte prøvene. For NDF og aNDFom er det størst forskjell er det mellom prøvene behandlet med GrasAAT SX og minst mellom prøvene behandlet med Maursyre 85%. De fortørkede inneholder også gjennomsnittlig 8,6 g/kg TS mindre WSC enn de våte prøvene, hvorav GrasAAT Plus har størst differanse og Uten tilsetning minst. I tillegg har mengden råprotein generelt blitt redusert av fortørkingen med gjennomsnittlig 7,8 g/kg, med unntak av GrasAAT Lacto, Maursyre 85 % og gras (utgangsmaterialet), hvorav både GrasAAT Lacto og Maursyre 85 % ga tilsvarende lik mengde råprotein i både våt og fortørket tilstand, mens gras hadde 16,5 g mer råprotein/kg TS i den fortørkede prøven sammenlignet med den våte.

4.3 In Vitro vomnedbrytning: Ankom Daisy II inkubator

4.3.1 *In vitro* sann fordøyelighet (IVTD%)

4.3.1.1 Effekt av fortørking

De fortørkede prøvene hadde alle lavere IVTD % enn de våte prøvene (Figur 23, vedlegg 3), med unntak av GrasAAT Lacto 96 timer som hadde IVTD % over tilsvarende våt prøve med 0,5 %.

Størst differanse i IVTD % mellom våte og fortørkede prøver ble funnet i prøver behandlet med Xtrasil Bio Lp (6 L/tonn grasmasse) og Xtrasil Bio Lp (3 L/tonn grasmasse) med henholdsvis 9,8 % og 8,0 % differanse ved 96 timer inkubering. Lavest differanse mellom våte og fortørkede prøver (96 timer inkubering) var for prøver tilsatt GrasAAT Lacto og GrasAAT Plus med en differanse på henholdsvis 0,5 % og 1,5 %.

4.3.1.2 Effekt av ensileringsmiddel

Ved 96 timer inkubering har det våte graset behandlet med Xtrasil Bio Lp (3 L/tonn grasmasse) hatt størst økning i IVTD % med 4,4 % over kontroll uten tilsetning etterfulgt av Kofasil Lp med 2,6 %, GrasAAT SX med 2,3 %, Xtrasil Bio Lp (6 L/tonn grasmasse) med 2,1 % og GrasAAT Plus med 0,3 % over kontroll. Resterende behandlinger var under kontrollen ved 96 timer inkubering.

Av de fortørkede prøvene var det kun GrassAAT Lacto, GrasAAT Plus og Maursyre 85% som hadde IVTD % (TS basis) over kontroll Uten tilsetning (nr. 28) med henholdsvis 2,3 %, 2,1 % og 0,9 % ved 96 timer inkubering.

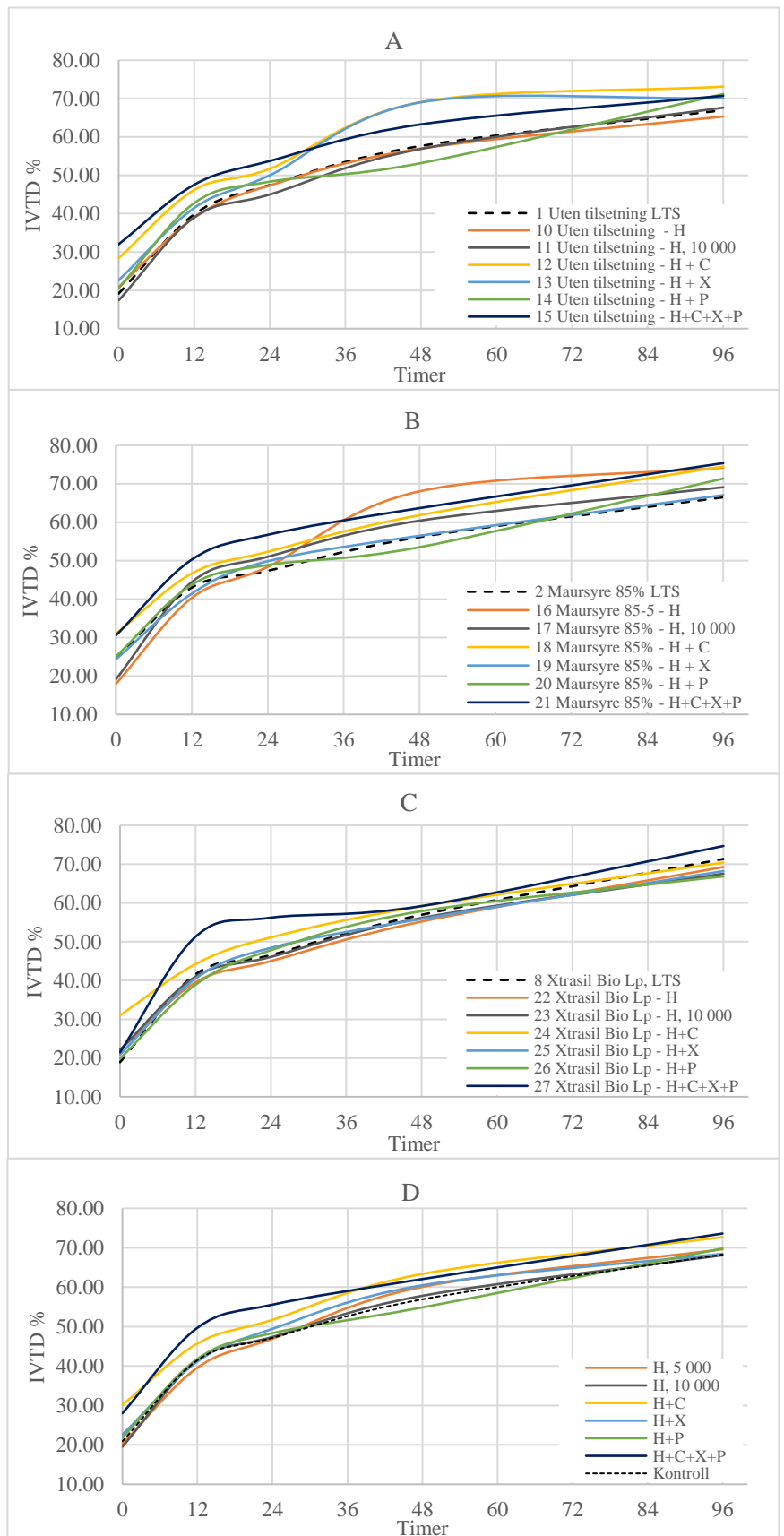
Ved 96 timer inkubering var det kun Kofasil Ultra som gjorde det dårligere enn kontroll i både våt og fortørket tilstand og GrasAAT Plus som gjorde det bedre enn kontrollen både fortørket og våt tilstand

4.3.1.3 Effekt av enzymer

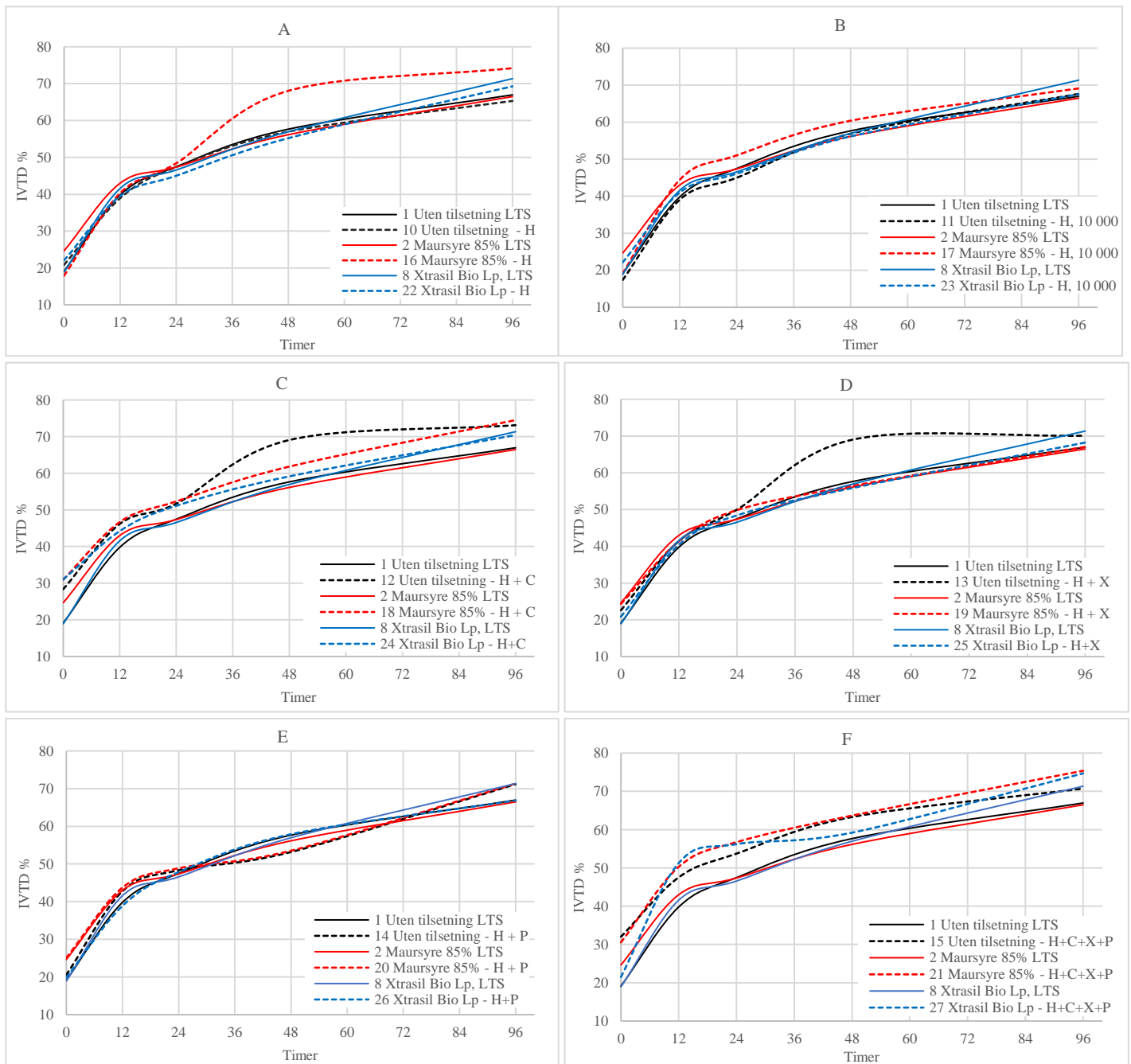
Effekten og fordøyelsesmønsteret ulike enzymer og ensileringsmidler har på fordøyeligheten av TS er vist i figur 12 og 13. Figurene 12A (Uten tilsetning), 12B (Maursyre 85%) og 12C (Xtrasil Bio Lp) inneholder alle seks ulike enzymbehandlinger og en kontroll uten enzym. Gjennomsnittet av 12A, 12B og 12C for de ulike enzymbehandlingene og kontroll er vist i Figur 12D.

Kun en av de enzymbehandlede prøvene Uten ensileringsmiddel (H) hadde lavere IVTD % enn kontrollen ved 96 timer inkubering (figur 12A), mens alle prøvene tilsatt Maursyre 85% og enzymer har økt IVTD% etter 96 timer inkubering sammenlignet med kontroll (figur 12B). Kun en prøve tilsatt Xtrasil Bio Lp (H+C+X+P) hadde høyere IVTD % enn kontrollen med 3,4 % (figur 12C).

Gjennomsnittet av de ulike enzymbehandlingene viser at H+C og H+C+X+P hadde størst IVTD % med henholdsvis 4,4 % og 5,3 % over kontroll, og H (10 000 U) hadde lavest IVTD % med 0,2 % under kontroll (figur 12D).



Figur 12: IVTD % for ulike enzymbehandlede prøver uten ensileringsmiddel (A), maursyre 85% (B) og Xtrasil Bio Lp (C) sammenlignet med kontroll uten enzym. D er gjennomsnittlige IVTD %-verdier for de enkelte enzymbehandlingene og kontrollen i A, B og C.



Figur 13: IVTD % for ulike enzymbehandlinger og ensileringsmidler. Hver graf inneholder tre enzymbehandlinger med samme enzym for tre ulike ensileringsmidler (uten tilsetning, maursyre 85 % og Xtrasil Bio Lp (3 L/tonn grasmasse)), samt en kontroll uten enzym for hver av ensileringsmidlene. Enzymbehandlinger består av hemicellulase 5 000 U/kg gras (A), hemicellulase 10 000 U/kg gras (B), hemicellulase og cellulase (C), hemicellulase og xylanase (D), hemicellulase og pektinase (E) og hemicellulase, cellulase, xylanase og pektinase (F).

Figur 13B og 13E viser liten effekt av både ensileringsmiddel og enzymer, mens 13A, 13C, 13D og 13F viser en effekt av ensileringsmiddel og/eller enzym for en eller flere av prøvene.

I figur 13A har Maursyre 85 % (H, 5000 U) gjennomsnittlig 9,8 % høyere økning i TS-nedbrytning mellom 24-48 timer inkubering sammenlignet med resterende behandlinger. Økningen avtar, og er lavere enn resterende behandlinger fra 48 timer, men Maursyre 85 % (H, 5000 U) har likevel høyest IVTD % fra 48-96 timer. Figur 13C viser et tydelig skille

mellom kontroll og enzymer da enzymene (H+C) ligger over kontrollen for alle tidspunkt og ensileringsmidler med unntak av Xtrasil Bio Lp som er 0,9 % under kontrollen ved 96 timer. I Figur 13D har Uten tilsetning (H+X) gjennomsnittlig 10,4 % høyere TS-nedbrytning fra 24-48 timer enn resterende prøvene (enzym + kontroll), men TS-nedbrytningen stopper opp for så å holde seg stabil fram til 96 timer (ca. 70 % ved 48-96 timer). Figur 13F viser som figur 13C et tydelig skille mellom kontroll og enzym da alle enzymbehandlingene (H+C+X+P) ligger over sine respektive kontroller under hele inkuberingen.

Nedbrytningskinetikken for TS viser i tillegg tendenser til 2 «pooler» for alle enzymbehandlingene da de har en rask nedbrytning i starten av inkuberingen, for så å stoppe opp og få en tregere, men fortsatt jevn nedbrytnings-kurve fram til 96 timer. Dette ble også observert for de våte prøvene.

4.3.2 Nedbrutt NDF

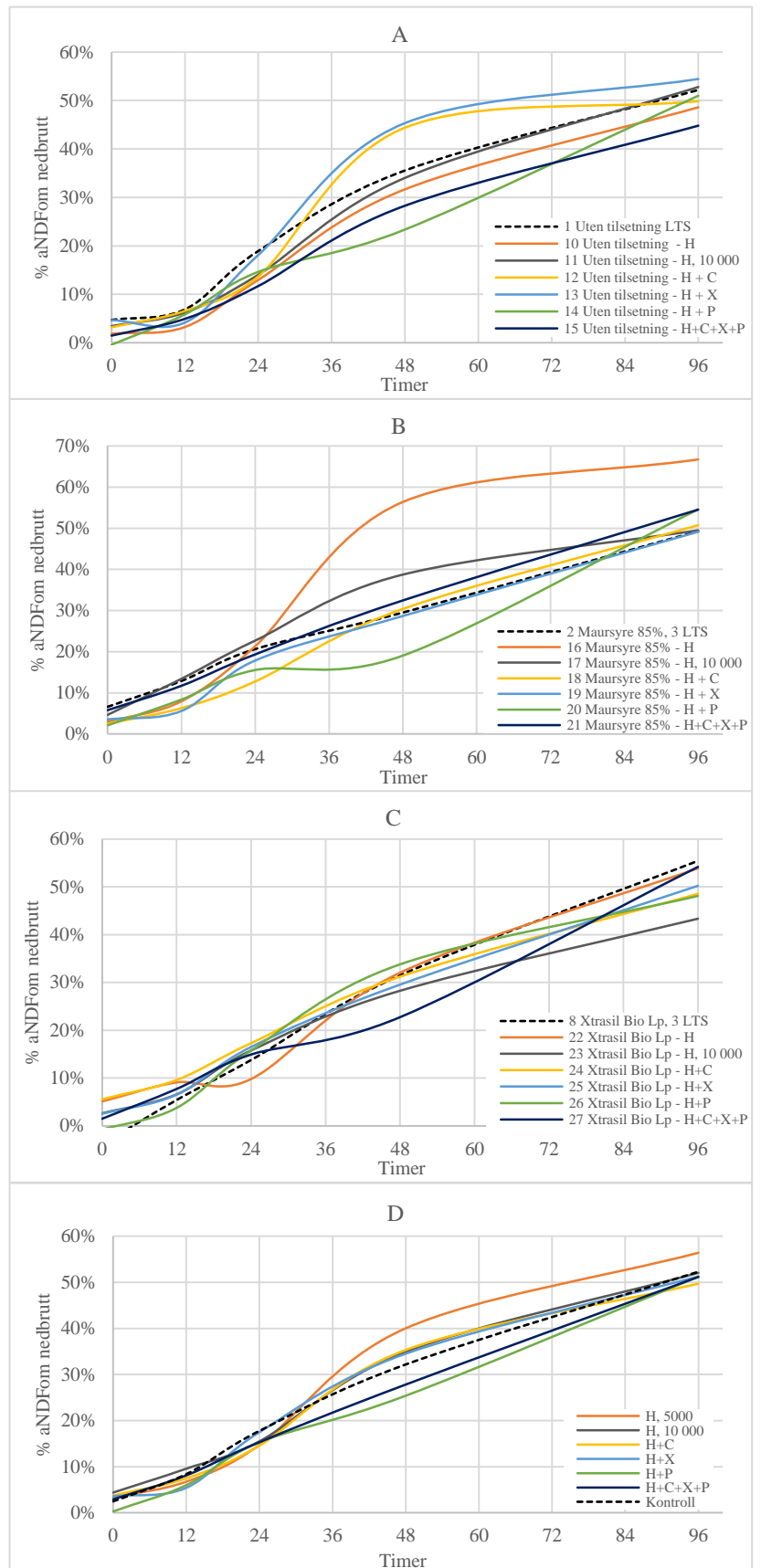
Gjennomsnittlig har enzymbehandlingene med Maursyre 85 % høyest nedbrytning av aNDFom med 54,2 %, etterfulgt av Uten tilsetning med 50,2 % og Xtrasil Bio Lp med 49,7 %.

Figur 14 viser at ulike enzymer resulterer i ulike nedbrytningsmønstre for ulike ensileringsmidler. For prøvene Uten tilsetning (figur 14A) starter enzymbehandlingene å gi varierende resultater etter ca 30 timer inkubering, hvorav H+C og H+X får økt nedbrytningsgrad, og H+P redusert nedbrytningsgrad fram til 36 timer hvor nedbrytningsgraden øker fram til 96 timer. Ved 96 timer ligger enzymbehandlingene mellom 44,8 % - 54,4 % nedbrutt aNDFom med H+X som høyeste og H+C+X+P som laveste. Kun H+X og H, 10 000 U var noe over kontrollen ved 96 timer.

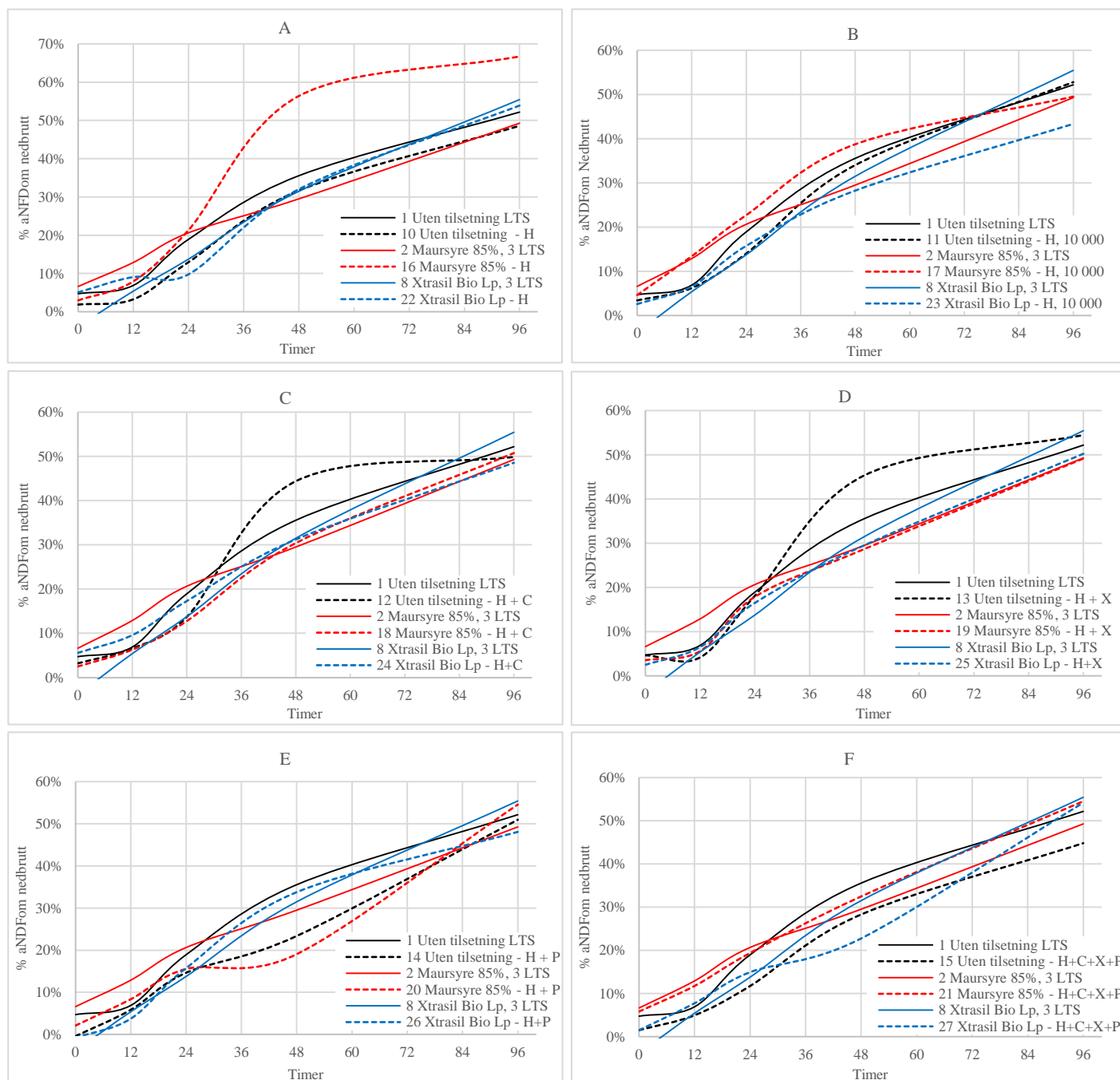
Figur 14B viser kraftig avvikende nedbrytning for noen av enzymbehandlingene tilsatt Maursyre 85 % sammenlignet med kontroll. Prøven tilsatt H+P hadde redusert nedbrytning fra 24-48 timer for så å øke kraftig fram til 96 timer, mens prøven tilsatt H (5000 U) hadde en kraftig nedbrytning av aNDFom mellom 12 og 48 timer inkubering. Ved 96 timer inkubering har enzymbehandlingene med Maursyre 85 % en nedbrytning mellom 49,1 % - 66,7 % hvor H+X har lavest, og H (5000 U) høyest. Kun H+X hadde marginalt lavere NDF-nedbrytning enn kontroll ved 96 timer med 0,1 %.

Enzymbehandlingene tilsatt Xtrasil Bio Lp ligger alle unntatt H+C+X+P rundt kontrollen, fram til 48 timer hvor de gradvis får lavere nedbrytning fram til 96 timer (figur 14C). H+C+X+P har en lavere nedbrytning fra 24-36 timer før nedbrytningen øker fram til 96 timer. Ved 96 timer inkubering ligger enzymbehandlingene mellom 43,3% - 54,2 % nedbrutt, hvorav H (10 000 U) har lavest og H+C+X+P høyest nedbrytning. Ingen av enzymbehandlingene hadde høyere andel nedbrutt enn kontrollen (Xtrasil Bio Lp) ved 96 timer inkubering.

Gjennomsnittet (figur 14D) viser at H (5000 U) skiller seg ut og lå høyere enn resterende behandlinger fra rundt 30 timer inkubering. H+P og H+C+X+P lå begge under resterende behandlinger fra rundt 30-80 timer inkubering. Ved 96 timer er det kun H (5000 U) som har høyere nedbrytning av aNDFom enn kontrollen med 4,1 %.



Figur 14: Nedbrutt aNDFom (%) for ulike enzymbehandlede prøver uten ensileringsmiddel (A), maursyre 85% (B) og Xtrasil Bio Lp (C) sammenlignet med kontroll uten enzym. D er gjennomsnittlig mengde nedbrutt aNDFom (%) for de enkelte enzymbehandlingene og kontrollen i A, B og C.



Figur 15. Nedbrytning av aNDFom for ulike enzymbehandlinger og ensileringsmidler. Hver graf inneholder tre enzymbehandlinger med samme enzym for tre ulike ensileringsmidler (uten tilsetning, maursyre 85 % og Xtrasil Bio Lp (3 L/tonn grasmasse)), samt en kontroll uten enzym for hver av ensileringsmidlene. Enzymbehandlingene består av hemicellulase 5 000 U/kg gras (A), hemicellulase 10 000 U/kg gras (B), hemicellulase og cellulase (C), hemicellulase og xylanase (D), hemicellulase og pektinase (E) og hemicellulase, cellulase, xylanase og pektinase (F).

Figur 15A viser at Maursyre 85 % har hatt størst effekt av H (5000 U), og har en høyere nedbrytning fra 12-48 timer sammenlignet med resterende behandlinger. Ved 96 timer inkubering har Maursyre 85 % (H, 5000 U) 17,4 % mer nedbrutt aNDFom enn kontroll, mens Uten tilsetning og Xtrasil Bio Lp har henholdsvis 3,6 % og 1,6 % mindre nedbrutt aNDFom enn sine respektive kontroller. I figur 15B har Maursyre 85 % (H, 10 000 U) høyere nedbrytning enn kontrollen fra 12-48 timer, men nedbrytningen er likevel tilnærmet lik kontrollen ved 96 timer. Xtrasil Bio Lp (H, 10 000 U) har generelt en lavere nedbrytning, og har ved 96 timer 12,1 % lavere NDF nedbrytning enn kontroll.

De to enzymbehandlingene i figur 15C (H+C) og 15D (H+X) har relativt like nedbrytningsmønstre for alle ensileringsmidlene. Uten tilsetning har en høy nedbrytning av NDF de første 48 timene for så å stoppe helt (H+C) eller nesten (H+X) opp fram til 96 timer inkubering.

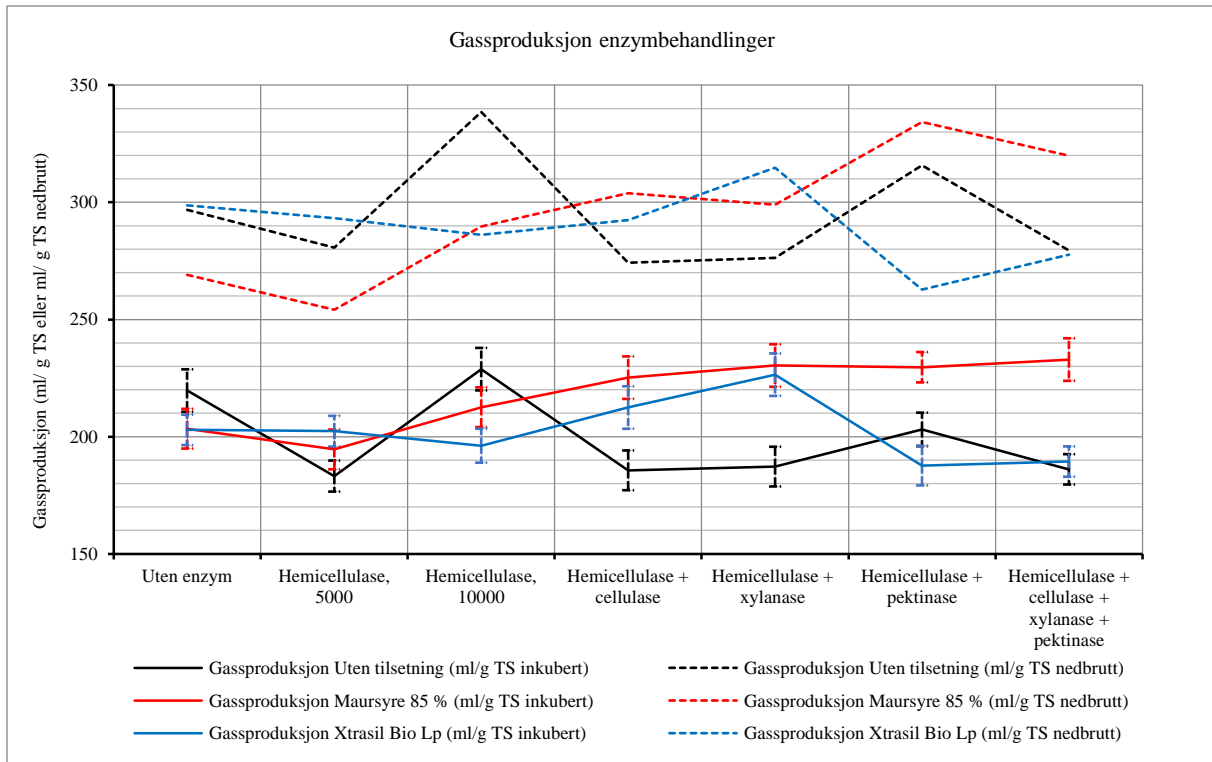
I figur 15E følger Maursyre 85 % (H+P) og Uten tilsetning (H+P) samme nedbrytningsmønster, hvor nedbrytningen blir redusert fra 24 timer inkubering før den gradvis øker fram til 96 timer. Ved 96 timer har både Maursyre 85 % (H+P) og Uten tilsetning (H+P) høy nedbrytningsgrad, og kunne hatt betraktelig høyere nedbrytning ved lenger inkuberingstid.

Ved 96 timer inkubering har Maursyre 85 % (H+C+X+P) 5,2 % høyere nedbrytning enn kontrollen, Uten tilsetning (H+C+X+P) 7,4 % lavere nedbrytning enn kontrollen, og Xtrasil Bio Lp (H+C+X+P) 1,3 % lavere nedbrytning enn kontrollen (figur 15F). Xtrasil Bio Lp (H+C+X+P) har likevel høy nedbrytningsgrad ved 96 timer, og kunne raskt tatt igjen kontrollen ved lenger inkubering.

4.4 In Vitro vomnedbrytning: Ankom gassproduksjonssystem

4.4.1 Effekt av enzymer på gassproduksjonen

Figur 16 viser forskjeller i gassproduksjon (GP) i ml/g TS inkubert og ml/g TS nedbrutt for alle enzymbehandlinger Uten tilsetning, og med Maursyre 85 % og Xtrasil Bio Lp. Figur 17 viser nedbrytningen (g/100 g TS) for de tre ensileringsmidlene i kombinasjon med enzymer.

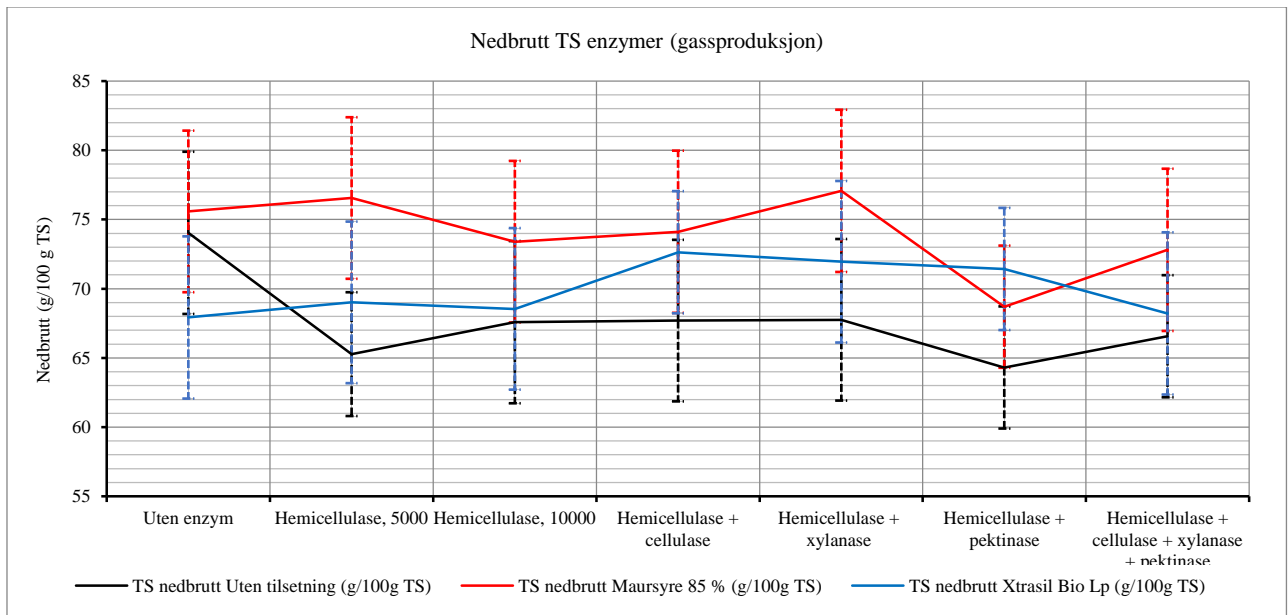


Figur 16: Gassproduksjonen for alle enzymbehandlinger og ensileringsmidler (Uten tilsetning, Maursyre 85% og Xtrasil Bio Lp (3L/tonn grasmasse) oppgitt i ml/g TS inkubert og ml/g TS nedbrutt.

Størst differanse i GP mellom ensileringsmidlene for samme enzym er mellom Uten tilsetning og Maursyre 85 % for H+C+X+P med en differanse på 46,9 ml/g TS inkubert, og mellom Maursyre 85 % og Xtrasil Bio Lp for H+P med en differanse på 71,5 ml/g TS nedbrutt.

Differansen i GP (ml/g TS inkubert) er mellom høyeste (Maursyre 85 %, H+C+X+P) og laveste (Uten tilsetning, H, 5000 U) 49,7 ml/g TS inkubert, mens forskjellen i ml/g TS nedbrutt er mellom høyeste (Uten tilsetning (H, 10 000 U)) og laveste (Maursyre 85 % (H, 5000 U)) 84,4 ml/g TS nedbrutt.

Av ensileringsmidlene har Maursyre 85 % gjennomsnittlig høyest nedbrytning (g/100 g TS) med 73,8 %, etterfulgt av Xtrasil Bio Lp med 70,3 % og Uten tilsetning med 66,5 % (figur 17).



Figur 17: Mengden TS nedbrutt (g/100 g) ved 72 timer inkubering for alle enzymbehandlede prøver.

Alle enzymbehandlingene Uten tilsetning har lavere andel nedbrutt enn kontrollen uten enzym med 6,3-9,7 %, hvorav H+X har minst reduksjon og H+P har størst reduksjon.

Enzymbehandlingene tilsatt Xtrasil Bio Lp har derimot alle høyere andel nedbrutt enn kontrollen med 0,3-4,7 %, hvorav H+C+X+P har hatt minst økning og H+C størst økning.

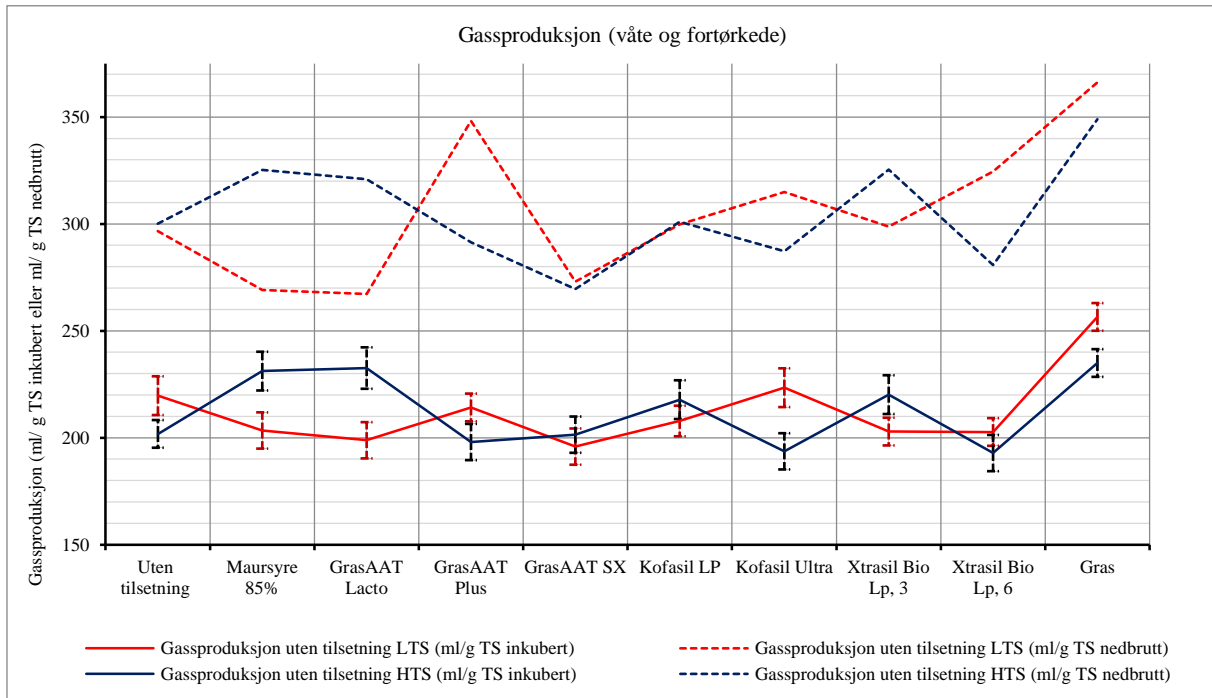
Enzymbehandlingene med Maursyre 85 % har hatt mer varierende resultater, og kun H (5000 U) og H+X har høyere andel nedbrutt enn kontrollen uten enzym med henholdsvis 1,0 % og 1,5 %. Resterende enzymbehandling har lavere andel nedbrutt enn kontrollen uten enzym med 1,0-6,9 %.

Enzymbehandlingene som ga størst differanse i nedbrytning mellom ensileringsmidlene (høyeste og laveste) var H (5000 U) og H+X med henholdsvis med 11,3 % og 9,3 %. H (10 000 U) ga lavest differanse i nedbrytning mellom ensileringsmidlene med 5,8 %.

4.4.2 Effekt av fortørking på gassproduksjonen

Figur 18 viser forskjeller i gassproduksjon (GP) i ml/g TS inkubert og ml/g TS nedbrutt mellom våte og fortørkede prøver for ti ulike behandlinger, mens figur 19 viser nedbrytningen av TS (g/100 g TS) for alle ti behandlingene i våt og fortørket tilstand.

NDF, aNDFom, ADF, ADFom

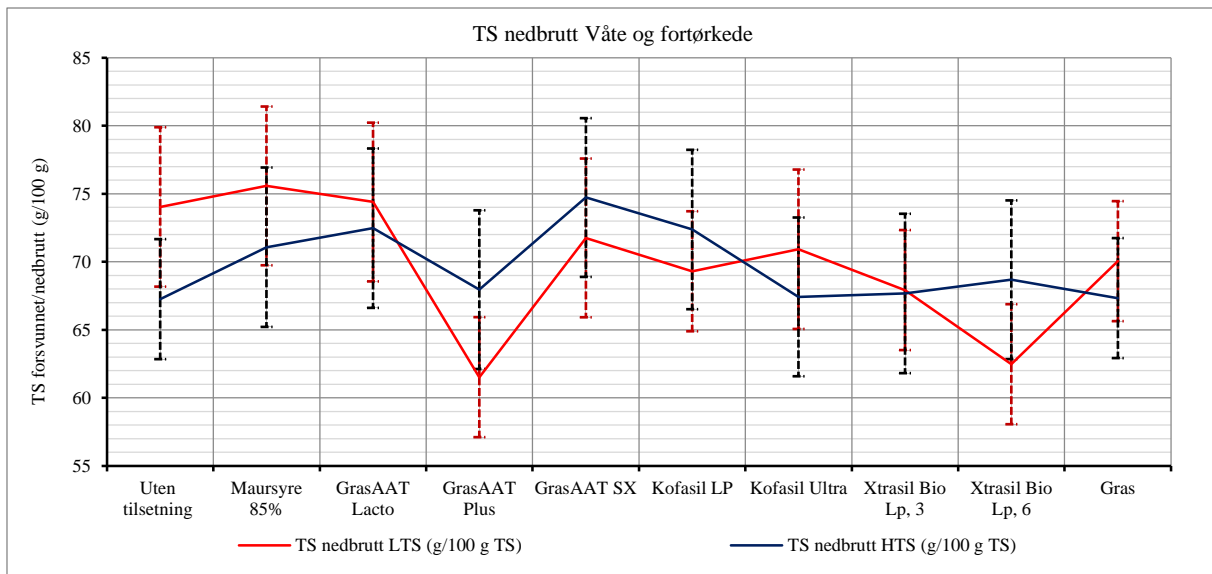


Figur 18: Gassproduksjonen for alle våte og fortørkede prøver uten enzymer oppgitt i ml/g TS inkubert og ml/g TS nedbrutt.

Av alle prøvene har Gras høyest GP for både våte og fortørkede prøver (inkubert og nedbrutt). Av de ensilerte prøvene med LTS har Kofasil Ultra (inkubert) og GrasAAT Plus (nedbrutt) høyest GP, mens GrasAAT SX (inkubert) og GrasAAT Lacto (nedbrutt) har lavest GP. Differansen i GP mellom høyeste og laveste er 27,5 ml/g TS inkubert og 80,9 ml/g TS nedbrutt.

For prøvene med HTS har GrasAAT Lacto (inkubert) og Xtrasil Bio LP (3 L/tonn grasmasse) (nedbrutt) høyest GP, mens Xtrasil Bio LP (6 L/tonn grasmasse) (inkubert) og GrasAAT SX (nedbrutt) har lavest GP. Differansen i GP mellom høyeste og laveste er 39,7 ml/g TS inkubert og 55,7 ml/g TS nedbrutt.

Av ensileringsmidlene ga GrasAAT Lacto (inkubert) og GrassAAT Plus (nedbrutt) størst differanse i GP mellom våt og fortørket prøve med henholdsvis 33,8 ml/g TS inkubert og 56,7 ml/g TS nedbrutt.



Figur 19: Mengden TS nedbrutt (g/100 g) ved 72 timer inkubering for alle våte og fortørkede prøver uten enzymer.

Av prøvene med LTS hadde GrasAAT Plus lavest nedbrytning og Maursyre 85 % høyest nedbrytning, mens for prøvene med HTS hadde Uten tilsetning lavest nedbrytning og GrasAAT SX høyest nedbrytning.

Av prøvene med LTS er det kun Maursyre 85 % og GrasAAT Lacto som har høyere TS-nedbrytning enn kontrollen. Størst differanse fra kontroll er det for prøvene behandlet med GrasAAT Plus (12,5 %-enheter under kontroll) og Xtrasil Bio Lp (6 L/tonn grasmasse) (11,6 %-enheter under kontroll). Alle prøvene med HTS har høyere TS-nedbrytning enn kontrollen uten tilsetning med 0,2 % til 7,5 %-enheter, hvorav Kofasil ultra har lavest økning GrasAAT SX størst økning.

Differansen i nedbrytning mellom LTS og HTS for de ulike ensileringsmidlene er størst med Uten tilsetning med 6,8 %, etterfulgt av GrasAAT Plus med 6,4 % og Xtrasil Bio Lp (6 L/tonn grasmasse) med 6,2 %. Minst differanse er det med Xtrasil Bio Lp (3 L/tonn grasmasse) med 0,3 %.

5. Diskusjon

I denne oppgaven er det kun brukt en type gras som var sent høstet for å få høyt fiberinnhold. En del av dette ble fortørket for å øke TS-innholdet, mens en annen del ble ensilert direkte i våt tilstand. Det er viktig å huske på at næringsverdien og fordøyeligheten av fôret i større grad er påvirket av plantens botaniske sammensetning og utviklingstrinn enn ensileringsmidler (Holte, 2012). Resultatene vil dermed variere ved bruk av annet plantematerialet.

5.1 Aerob stabilitet

Temperaturmessig var ingen av behandlingene mer enn 2 °C over romtemperatur, og kan dermed regnes som stabile. Det må likevel nevnes at romtemperaturen ikke var stabil under måleperioden (figur 8), og påvirket i stor grad temperaturen i prøvene. Det er dermed vanskelig å bedømme hvor stabil temperaturen i prøvene faktisk var. For å bedømme den aerobiske stabiliteten vil jeg dermed se på muggdannelsen i de ulike prøvene framfor temperaturøkning.

Forsøk av Randby (2010) viste at kontroll uten tilsetning og surfôr behandlet med inokulant hadde lavere aerobisk stabilitet, mens surfôr behandlet med Kofasil Ultra ga høyere aerobisk stabilitet. Kofasil Ultra viste i dette forsøket ingen tegn til muggdannelse, mens både kontrollen Uten tilsetning (LTS) og begge prøvene tilsatt Xtrasil Bio Lp (LTS) hadde raskest muggvekst av ensileringsmidlene (figur 11), samt høyest grad av muggdannelse etter 14 dager (figur 10). Det var som forventet ettersom verken kontrollen Uten ensileringsmiddel eller prøvene tilsatt Xtrasil Bio Lp inneholder noen form for sopphekkende eller direkte pH senkende middel. I tillegg vil surfôr med mye melkesyre være spesielt utsatt for varmgang etter åpning da melkesyren kan bli brukt som substrat av mikroorganismer (Mo, 2005). Ingen av GrasAAT midlene viste tegn til muggdannelse under hele måleperioden. Dette kan være fordi GrasAAT-midlene inneholder organiske syrer og salter som forsinker aerobisk forringelse når fôret er i kontakt med oksygen (Kung Jr et al., 2003).

Studier tyder på at bruk av enzymer gir redusert aerobisk stabilitet (Spoelstra et al., 1992), da økt frigjøring av WSC vil øke gjær- og muggsoppens tilgjengelighet på substrat (Kung & Muck, 2015). Resultatene fra dette forsøket tyder på at Maursyre 85 % og Uten tilsetning i kombinasjon med enzym vil gi redusert aerobisk kvalitet sammenlignet med kontroll uten enzym, mens gras behandlet med Xtrasil Bio Lp og enzymer vil i de fleste tilfeller gi økt aerobisk stabilitet sammenlignet med kontroll uten enzym. Likevel vil gras behandlet med

Maursyre 85 % mugne tregere og i lavere grad enn gras behandlet uten ensileringsmiddel eller med Xtrasil Bio Lp. Dette kan være fordi maursyre er en sterk syre som senker pH og forbedrer den aerobiske stailiteten (Henderson et al., 1972)

Under måleperioden er det mulig at prøvene ble smittet av hverandre da samme termometer ble benyttet i alle prøver. Selv om termometeret ble vasket/tørket av mellom hver prøve er det mulig at mugg og muggsporer fra en prøve fortsatt kan ha sittet igjen på termometeret og blitt overflyttet til neste prøve.

5.2 Kjemisk innhold

Det kjemiske innholdet (tabell 4) i de ferdig ensilerte prøvene viste noen uventede resultater da alle prøvene generelt hadde høyt askeinnhold (g/kg TS) med verdier mellom 92,9 (nr.17) og 101,3 (nr. 27). Utgangsmaterialet hadde verdier på henholdsvis 82,7 (nr.37) og 87,9 (nr. 38). Graset benyttet i dette forsøket var seint høstet, og ettersom askeinnholdet burde reduseres med økende utviklingstrinn kan det høye innholdet i prøvene indikere jordforurensning som kan ha negativ påvirkning på fôrets hygieniske kvalitet (Eurofins, 2018b).

I tillegg hadde alle ensilerte prøver redusert andel WSC sammenlignet med utgangsmaterialet (prøve nr. 37 og 38), sannsynligvis grunnet mikrobielt bruk av WSC under fermenteringen. Den mikrobielle aktiviteten i prøve 37 og 38 ble raskt opphørt da begge prøver ble fryst ned hurtig etter høsting (37) og fortørking (38). Det fortørkede graset har litt mindre WSC enn det våte da en del WSC har gått tapt gjennom respirasjonen under fortørkingsprosessen.

Kjemiske analyser er ikke 100 % nøyaktige og har en feilmargin. Variasjon mellom tilsynelatende like prøver kan være grunnet feil på kjemiske analyser, eller at samplingen av prøven ikke har vært homogen. Det er også få replikater per prøve, som gjør svaret mer usikkert.

5.2.1 Effekt av ensileringsmidler på kjemisk innhold

I følge Eurofins (2018b) er kritisk pH for å oppnå et stabilt miljø i fôret 4,1, 4,6 og 4,75 for fôr med tørrstoffprosent på 15 %, 35 % og 40 %. Ved åpning var det kun pose 7A (Kofasil Ultra) som overskred pH grensene til Eurofins. Høy pH kan blant annet komme av unormal høy bufferkapasitet (for eksempel høyt protein og askeinnhold) (Kung et al., 2018), eller treg fermentering som kan gi vekst av uønskede mikroorganismer som forringer fôret (Lallemand, 2016). Det er likevel lite som indikerer at 7A har høyere bufferkapasitet enn andre prøver da 6A, 7B og 9A alle har høyere innhold av aske og råprotein (g/kg TS), men likevel lavere pH

enn 7A. Det er heller ingen klare tegn på økt framvekst av uønskede mikroorganismer under fermenteringen da verken 7A eller 7B fikk muggdannelse ved testingen av aerob stabilitet. Dette kan igjen ha sammenheng med at Kofasil Ultra inneholder natriumbenzoat og natriumpropionat som gir et mer stabilt surfôr som bruker lenger tid før det blir varmgang og mugg etter lufteksponering (Felleskjøpet, 2010).

Haigh og Parker (1985) fant i sitt forsøk at maursyre ga signifikant lavere pH sammenlignet med en ubehandlet ensilage og en kombinasjon av maursyre og formiat. Dette gjenspeiler resultatene funnet i dette forsøket da prøve nr. 2 (Maursyre 85 %) hadde lavest pH av alle prøvene. I tillegg har alle prøver tilsatt Maursyre 85 % eller en kombinasjon av maursyre og formiat (GrasAAT-produktene) mer WSC både i våt og fortørket tilstand sammenlignet med kontroll uten tilsetning. En forklaring på dette er at tilsetning av betraktelige mengder maursyre gir en rask pH-senkning som fører til begrenset fermentering og dermed økt mengde WSC i det ferdig ensilerte fôret (Carpintero et al., 1979).

Holte (2012) fant i sitt forsøk at et surfôr ensilert med Sil-All (melkesyre + enzymer) hadde signifikant lavere sukkerinnhold sammenlignet med kontroll og fermenteringshemmere. Også (Driehuis et al., 1997) fikk høyere sukkerinnhold etter ensilering ved bruk av inokulant sammenlignet med kontroll. Dette stemmer ikke med resultatene i dette forsøket da Uten tilsetning hadde lavere WSC-verdier etter ensilering enn Xtrasil Bio Lp. Likevel hadde alle prøver Uten tilsetning og med Xtrasil Bio Lp som forventet lavere WSC-verdier enn resterende ensileringsmidler etter ensilering. Xtrasil Bio Lp og Uten tilsetning var også de behandlingene som utviklet muggvekst raskest, som kan indikere at disse prøvene inneholdt en høyere andel uønskede mikroorganismer. Dette kan komme av en mer ekstensiv fermentering som har gitt et tregere pH fall og dermed økt forbruk av WSC til vekst av uønskede mikroorganismer.

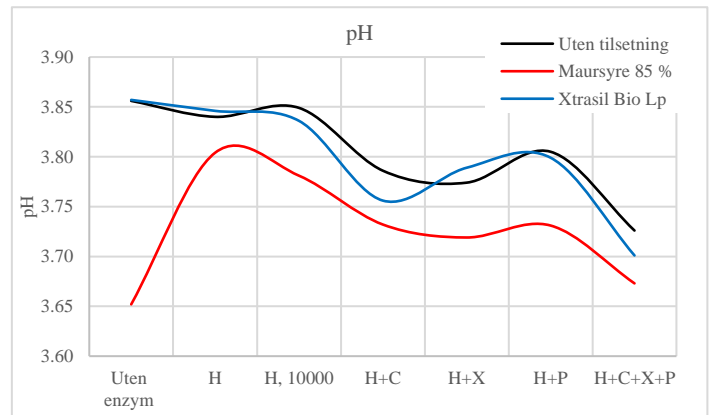
Det er tidligere dokumentert at maursyre begrenser fermenteringen og nedbrytningen av protein (McDonald et al., 1991; Winters et al., 2001). Resultatene i dette forsøket viser derimot at prøver tilsatt maursyreholdige ensileringsmidler (Maursyre 85 % og GrasAAT-midlene) generelt inneholder en lavere andel råprotein etter ensilering enn resterende ensileringsmidler. Det kan likevel tenkes at de maursyreholdige midlene har hatt en lavere proteolyse enn midlene uten maursyre da proteinverdiene i denne oppgaven er beregnet ut fra mengden N i prøven ($N \cdot 6,25$). Proteiner inneholder en lavere prosentandel N sammenlignet med nedbrutt protein og andre N-holdige forbindelser (Urea, ammoniakk, nitrater), og dermed vil nedbrutt protein og andre N-holdige forbindelser gi en høyere estimert proteinverdi enn det

prøven faktisk inneholder. Prøver med lave råproteinverdier vil dermed ikke nødvendigvis inneholde mindre protein, men kan ha hatt en lavere grad av proteolyse under ensileringsprosessen. Dette kan også forklare hvorfor de ensilerte prøvene har høyere råproteinverdier enn gras før ensilering ettersom en del av proteinene har blitt brutt ned under ensileringsprosessen.

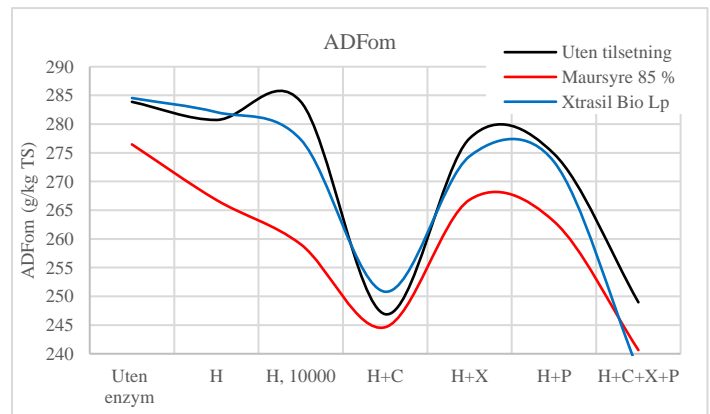
5.2.2 Effekt av enzymer på kjemisk innhold

Forsøk viser at NDF konsentrasjonen i surfôr av hundegras og alfalfa ble redusert med økt mengde cellulase (Nadeau et al., 2000a), og at en blanding av hemicellulase og cellulase reduserte konsentrasjonen av NDF og ADF under ensileringsprosessen sammenlignet med en kontroll uten tilsetning (Chamberlain & Robertson, 1992). Dette samsvarer med resultatene i dette forsøket da

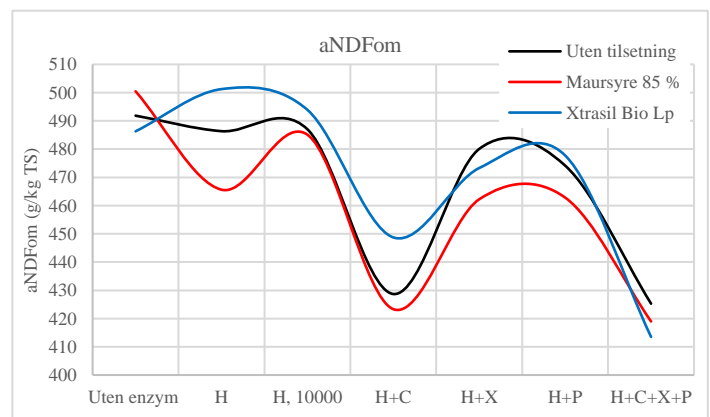
enzymbehandlingene med cellulase (H+C og H+C+X+P) har redusert mengde ADF og NDF etter ensilering sammenlignet med resterende enzymbehandlinger og kontroller (figur 21 og 22). Cellulasebehandlede prøver hadde også generelt lave pH-verdier (figur 20), som indikerer en økt syreproduksjon grunnet melkesyrebakterienes økte tilgjengelighet på substrat (Muck et al., 2018). Prøvene tilsatt cellulase har også en mindre andel hemicellulose (NDF-ADF) igjen etter ensilering sammenlignet med andre enzymbehandlinger og kontroll. Prøver tilsatt H+C+X+P hadde lavere pH og mindre ADF og NDF etter ensilering enn prøver tilsatt H+C. Prøvene tilsatt kun H (både 5000 og 10 000 U) har derimot generelt høyere pH og mer ADF og NDF igjen etter ensilering enn de andre



Figur 20: pH i enzymbehandlede prøver.



Figur 21: ADFom for ulike enzymbehandlinger og ensileringsmidler



Figur 22: NDF i enzymbehandlede prøver med ulike ensileringsmidler

enzymbehandlingene. Dette indikerer at disse prøvene har hatt en lavere nedbrytning av komplekse karbohydrater til sukker og dermed en mindre syreproduksjon og lavere pH senkning under ensileringen enn resterende enzymbehandlinger.

Korrelasjonen mellom de ulike ensileringsmidlene er høy for ADF, NDF og pH som indikerer at enzymene har hatt en uniform virkning på fôret under fermenteringen uavhengig av ensileringsmiddel. Korrelasjonen mellom ADF og NDF er også høy (0,93). Likevel er det en liten effekt av ensileringsmiddel da enzymbehandlede prøver tilsatt Maursyre 85 % har en korrelasjon på 0,90 mellom ADF- og NDF-konsentrasjonen etter ensilering, mens Uten tilsetning og Xtrasil Bio Lp har hatt høyere korrelasjoner med henholdsvis 0,99 og 0,96. Maursyre 85 % har dermed hatt en større påvirkning på nedbrytningen av celleveggstoffene enn de andre ensileringsmidlene, trolig grunnet lavere pH.

Dean et al. (2005) fant at enzymbehandlet gras hadde mer WSC etter ensilering sammenlignet med kontroll. I dette forsøket var det derimot kun prøvene tilsatt Maursyre 85% og enzymer som hadde en betydelig økning i mengden WSC etter ensilering sammenlignet med kontroll. Mengden WSC tilgjengelig i fôret er sterkt relatert til fermenteringen, og god fôr kvalitet kommer ofte fra planter med høyt innhold av WSC (Bureenok et al., 2019). I følge Zhang et al. (2016a) er 60-70 g WSC/kg TS tilstrekkelig for fermenteringsprosessen. WSC-innholdet i utgangsmaterialet var i dette forsøket betydelig høyere enn anbefalingen, og burde ikke være en begrensning for verken vekst av LAB eller produksjon av melkesyre. Flere rapporterer om at fibrolytiske enzymer er fordelaktig i materialet med lite sukker (Muck et al., 2018), men ettersom utgangsmaterialet i dette tilfellet inneholdt tilstrekkelig WSC kan det tenkes at enzymtilsetningen ikke har hatt noen fordelaktig effekt. Hvorfor prøvene tilsatt Maursyre 85 % har et høyere innhold av WSC etter ensilering enn resterende enzymbehandlinger kan, som tidligere diskutert, ha sammenheng med at maursyre gir en rask pH senkning som begrenser fermenteringen og gir økt mengde WSC i fôret.

5.2.3 Effekt av fortørking på kjemisk innhold

Haigh og Parker (1985) fant ut at fortørking ga en signifikant økning i pH. Dette stemmer overens med funn i dette forsøket da alle prøver med HTS har høyere pH enn de med LTS. Dette er som forventet da fortørket gras generelt har en mindre omfattende fermentering og dermed mindre syredannelse som gir en høyere pH (Andrews et al., 2008; Pauly & Tham, 2003). Redusert fermentering kan også forklare hvorfor de fortørkede prøvene generelt har et høyere innhold av NDF og ADF etter ensilering enn de våte, da en mindre andel har blitt brutt ned. Gassakkumuleringen under var også mindre for de fortørkede prøvene, som betyr mindre

tap av næringsstoffer (Gordon, 1967), og kan bidra til å forklare hvorfor de fortørkede prøvene har en høyere andel strukturelle karbohydrater etter ensilering. Det er likevel ingen måte å si sikkert hvilke næringsstoffer som har gått tapt i form av gass ettersom gassen fra ensileringsposene ikke har blitt analysert. Gasstap under fermenteringen forklarer likevel ikke hvorfor det våte utgangsmaterialet har mindre NDF enn det fortørkede da disse ikke har hatt noen form for fermentering.

Sukkerinnholdet i de fortørkede prøvene er lavere enn for de våte, da en del WSC har gått tapt gjennom celleånding under tørkeprosessen (Eurofins, 2018b; Kval-Engstad, 2005). Det ser også ut til at andelen råprotein i fôret generelt har blitt redusert av fortørkingen. Flere studier viser at fortørking reduserer andelen råprotein i fôret (Zhang et al., 2019; Zheng et al., 2018), trolig grunnet at fortørket gras har mindre proteolyse sammenlignet med ikke-fortørket gras (Ling, 2007; Tyrolová & Výborná, 2011). Mindre proteolyse betyr at en mindre andel av proteinet har blitt brutt ned til aminosyrer og andre N-holdige forbindelser, og kan (som tidligere diskutert) gi feilaktig andel råprotein ettersom det er beregnet ut fra andelen N i prøven.

5.3 *In Vitro* vomnedbrytning: Daisy II

5.3.1 *In vitro* sann fordøyelighet av tørrstoff

IVTD måler prosentandelen TS som forsvinner etter inkubering i vomvæske ved et gitt tidspunkt (Hansey et al., 2010), og avhenger i stor grad av fôrets fysiske egenskaper, spesielt innholdet av fiber da lav andel ADF og NDF har vist seg å resultere i økt TS-fordøyelighet (Huhtanen et al., 2007; Zhang et al., 2016b). Dette stemmer godt overens med resultatene funnet i tabell 7 (vedlegg 6) da det er signifikante ($p < 0.05$) negative korrelasjoner mellom innholdet av NDF ($r = -0,8$) og ADF ($r = -0,56$) med IVTD % (96 timer). Økt andel NDF og ADF vil dermed redusere fordøyeligheten av TS. Det ble også funnet en signifikant positiv korrelasjon mellom innholdet av NFC_{ee} og IVTD % (96 timer) på 0,7.

Enzymbehandlede prøver, spesielt de tilsatt Maursyre 85 % og de tilsatt cellulase (H+C og H+C+X+P) har generelt høyere IVTD % enn resterende behandlinger, trolig fordi disse generelt inneholder en lavere andel ADF og NDF. Fôrene med lav IVTD % har derimot generelt høyt innhold av NDF, og består hovedsakelig av de fortørkede prøvene.

Nedbrytningskinetikken til prøvene med LTS (Enzymer + våte prøver) hadde tendenser til å brytes ned i to seksjoner. Dette vil si at en del først blir brutt ned for så å stoppe opp litt før en ny del blir brutt ned. I en såkalt «to pool modell» vil den første seksjonen, eller poolen, bestå

av rask nedbrytbare og løselige karbohydrater, samt komponenter med lavt C:N forhold. Nedbrytning i den andre poolen kan relateres til strukturelle karbohydrater og andre lignifiserte komponenter som er vanskeligere å bryte ned (Somda et al., 1995) Denne to-seksjons nedbrytningen ble ikke observert for de fortørkede prøvene, muligens fordi disse prøvene har en lavere andel lettløselige karbohydrater ettersom de har gjennomgått en mer ekstensiv fermentering og dermed mindre nedbrytning av celleveggstoffer under fermenteringsprosessen.

5.3.1.1 Effekt av fortørking på *in vitro* sann fordøyelighet av tørrstoff

Xiccato et al. (1998) fant at fortørking økte *in vitro* fordøyeligheten av ensilage. I dette tilfellet har derimot de fortørkede prøvene generelt lavere IVTD % enn de våte prøvene. Tap på jordet under tørking er en faktor som bidrar til at fordøyeligheten av fortørket gras er lavere enn for ikke-fortørket (Garnsworthy, 2013), og forlenget fortørking under dårlige værforhold har resultert i lavere fordøyelighet av fortørkede fôr sammenlignet med ikke-fortørket (Anderson, 1985). I dette tilfellet er det imidlertid ikke dårlige værforhold som har bidratt til at det fortørkede fôret har lavere fordøyelighet enn det våte da det ble tørket på lav temperatur i tørkeskap over natta.

5.3.1.2 Effekt av enzymer på *in vitro* sann fordøyelighet av tørrstoff

Bhasker et al. (2013) fant i sitt forsøk at tilsetning av cellulase både alene og i kombinasjon med xylanase resulterte i økt *in vitro* fordøyelighet av TS, mens Nadeau et al. (2000a) fant at cellulasebehandlet surfôr ikke forbedret *in vitro* fordøyeligheten. Resultater fra dette forsøket viser at enzymer generelt hadde en positiv effekt på fordøyeligheten av TS, hvorav prøvene tilsatt cellulase generelt hadde høyest IVTD % etter 96 timer sammenlignet resterende prøver.

Enzymbehandlede prøver Uten tilsetning og med Maursyre 85 % hadde sammenlignet med kontroll generelt økt TS-fordøyelighet, hvorav Maursyre 85 % gjennomsnittlig hadde høyest økning. Kombinasjonen av enzymer og Xtrasil Bio Lp ga derimot generelt lavere eller tilsvarende lik TS-fordøyelighet som kontroll (figur 12 og 13). Andre forsøk viser likevel at gras (*Leymus chinensis*) tilsatt inokulant og cellulase gir forbedret *in vitro* fordøyelighet (Tian et al., 2014).

5.3.1.3 Effekt av ensileringsmidler på *in vitro* sann fordøyelighet av tørrstoff

Resultatene viser at det ikke er noen systematisk forskjell mellom ensileringsmidlene, da de som har høy TS-fordøyelighet i våt tilstand ikke nødvendigvis har høy fordøyelighet av TS i

fortørket tilstand og visa versa. En forklaring på dette er at valg av ensileringsmiddel i stor grad bør velges ut fra TS-nivået på fôret (Holte, 2012), da ulike midler er beregnet for ulikt TS-nivå på fôret. I tillegg blir fermenteringen mer ekstensiv når TS-nivået på fôret øker (Williams et al., 1995), som vil resultere i ulik kjemiske sammensetning på fôret etter ensilering, og dermed ulik nedbrytning og fordøyelighet.

5.3.2 Nedbrytning av NDF

Enzymenes aktivitetsnivå og hvordan blandinger av enzymer oppfører seg er ofte uforutsigbart, og kan dermed føre til varierende resultater (Muck et al., 2018). Gallardo et al. (2010) fant at den potensielt nedbrytbare NDF-fraksjonen av alfalfa høy økte ved bruk av fibrolytiske enzymer. Tilsetning av enzymer har likevel hatt mer negative enn positive resultater på fiberfordøyelighet (Kung, 1998), da den enzymatiske hydrolysen bryter ned den fordøyelige fraksjonen, og etterlater seg en tregere og mindre fordøyelig fraksjon (Dehghani et al., 2012; Jin et al., 2015; Kung, 1998; Mo & Saue, 1988; Nadeau et al., 2000b). I tillegg vil evnen fibrolytiske enzymer har til å redusere innholdet av celleveggstoffer i plantematerialet reduseres med økende alder på planten (Van Vuuren et al., 1989). I dette tilfellet er det ingen gjennomgående trend at enzymbehandlingene verken har økt eller redusert andelen nedbrutt NDF, da NDF-fordøyeligheten varierer enormt både mellom og innad i de ulike enzymbehandlingene. Det er heller ingen klar effekt av verken ensileringsmiddel eller fortørking da det ikke er noen klar sammenheng med hva som gir høy og lav fordøyelighet.

Det er likevel en sammenheng med at de prøvene med høyest andel nedbrutt aNDFom generelt også har høy GP i ml/g TS nedbrutt, samt relativ høy GP i ml/g TS inkubert. Dette kan være fordi disse har en større andel potensielt nedbrytbart NDF enn de andre prøvene. Selv om andre næringsstoffer (protein) påvirker gassproduksjonen, dannes det en større andel gass fra nedbrytning av karbohydrater sammenlignet med proteiner. Gassproduksjonen dannet fra nedbrytningen av fett er ubetydelig da den er veldig lav (Makkar, 2004). Gassen dannet fra nedbrytningen av protein har likevel bidratt til den totale GP til fôrmiddelet og kan være en forklaring på hvorfor prøvene med høyest andel nedbrutt aNDFom ikke nødvendigvis har høyest GP.

5.4 *In Vitro* vomnedbrytning: Gassproduksjon

Gassen som blir produsert er både et resultat av fermenteringen av fôrmiddelet og den indirekte gassen produsert av bufferløsningen (Makkar, 2004) og vomvæsken. Den indirekte

gassen ble i dette forsøket korrigert for ved bruk av en blank prøve kun tilsatt bufferløsning og vomvæske.

Det er ingen klar indikasjon på at de våte prøvene gir høyere GP eller enn de fortørkede eller visa versa. Av enzymbehandlingene har generelt prøver behandlet med Maursyre 85 % høyest GP (ml/g TS nedbrutt / ml/g TS inkubert) etterfulgt av prøver behandlet med Xtrasil Bio Lp og deretter prøvene Uten tilsetning. Det er likevel store forskjeller i mengden gass produsert mellom enzymbehandlingene for de ulike ensileringsmidlene, og det er ingen spesifikk enzymbehandling som gir økt eller redusert GP for alle ensileringsmidlene. Det er heller ingen klar sammenheng i forskjell mellom ensileringsmidlene i mengden gass produsert under inkuberingen, da samme ensileringsmiddel har stor variasjon i GP både i våt og fortørket tilstand.

Forskjellene mellom prøvene kan likevel korreleres til den kjemiske sammensetningen da den vil påvirke gassproduksjonen. Som sagt dannes det en større andel gass ved nedbrytning av karbohydrater sammenlignet med proteiner, som igjen gir høyere GP enn fett (Makkar, 2004). Sammensetningen av karbohydratene i fôrmiddelet vil også kunne påvirke gassproduksjonen da det påvirker hvilke syrer som dannes når karbohydratene i fôret fermenteres, som igjen vil påvirke mengden gass som produseres (Makkar, 2004). For eksempel vil fermentering av fôrmidler med høyt stivelsesinnhold gi økt mengde propionsyre (Ørskov, 1986) som gir lavere gassproduksjon sammenlignet med fôrmidler som gir økt mengde eddiksyre (Makkar, 2004). I tillegg er kinetikken til gassproduksjonen avhengig av forholdet mellom løselig, potensielt løselig og uløselige fôrpartikler (Makkar, 2004), og materiale med høyt innhold av celleveggstoffer og lignin har vist seg å senke raten og omfanget av gassproduksjonen (Frutos et al., 2002; Getachew et al., 2000). Dette er trolig grunnet et høyere innhold av uløselige karbohydrater som ikke brytes ned eller fermenteres.

Alt dette tilsier at prøvene med lav GP kan inneholde en lavere andel løselige fôrpartikler enn prøvene med høy GP. Forskjeller stammer sannsynligvis fra hvor mye av fôrmiddelet som har blitt brutt ned under fermenteringen. Ensileringsmiddelet som har blitt benyttet på de ulike prøvene påvirker fermenteringen, både i rate og omfang, da ulike typer midler blant annet inneholder ulike syrer, salter og mikroorganismer som har en direkte effekt på fermenteringsmønsteret i fôret og dermed den kjemiske sammensetningen av det ferdig ensilerte materialet. I tillegg kan, som tidligere diskutert, TS-innholdet i fôret påvirke effekten av ensileringsmiddelet og dermed også fermenteringen og den kjemiske sammensetningen. Bruk av enzymer kan også, som tidligere diskutert, føre til varierende resultater, da det er

uvisst hvilke(n) og hvor stor andel av de ulike celleveggsfraksjonene (potensielt nedbrytbart og totalt ufordøyelig) som blir brutt ned og hva som blir igjen. Hva den gjenværende fraksjonen består av kan variere fra prøve til prøve, og kan være en forklaring på de store variasjonene i GP mellom og innad i enzymbehandlingene.

Graset (nr. 37 og 38) har veldig høy GP, hvorav det våte utgangsmaterialet har høyere GP enn det fortørkede. Begge grasprøvene har en intensiv gassproduksjon særlig i starten av inkuberingen, trolig grunnet høyt sukkerinnhold i disse prøvene sammenlignet med resterende prøver, samt større andel lett nedbrytbart NDF enn i de fermenterte prøvene da den lett nedbrytbare NDF fraksjonen ikke har blitt brutt ned under ensileringsprosessen.

Det er også funnet signifikante ($p < 0.05$) negative korrelasjoner mellom både askeinnhold ($r = -0.83$) og innhold av råprotein ($r = -0.82$) med gassproduksjonen ved 72 timer inkubering (tabell 7, vedlegg 6). I tillegg er det funnet en signifikant positiv korrelasjon mellom mengden WSC ($r = 0.8$) i fôret og GP ved 72 timer inkubering. Dette vil si at gassproduksjonen øker med reduserende innhold av aske og/eller råprotein, og/eller ved økende innhold av WSC i fôret.

Andelen nedbrutt er beregnet ut fra restfraksjonen som var igjen etter inkuberingen. I dette forsøket ga maursyrebaserte ensileringsmidler generelt høy andel nedbrutt (g/100 g TS) med unntak av GrasAAT Plus som sammen med Xtrasil Bio Lp er ensileringsmidlene som gjennomsnittlig ga lavest andel nedbrutt av både fortørkede og våte prøver. Av enzymbehandlingene ga de tilsatt Maursyre 85 % generelt høyere TS nedbrytning (g/100 g TS). Det er ingen klar forskjell mellom våte og fortørkede prøver i andelen nedbrutt.

Likevel er det en signifikant ($p < 0,05$) men liten negativ korrelasjon mellom andelen aske ($r = -0,32$) og andelen nedbrutt TS, samt små positive korrelasjoner mellom andelen WSC ($r = 0,34$) og NFCee ($r = 0,34$) i fôret med andelen nedbrutt TS. Det tilsier at nedbrytningen av TS øker med økende andel WSC og NFCee, og reduserende andel aske i fôret.

Det ble i dette forsøket kun inkubert tre paralleller per fôr grunnet forsinkelser og komplikasjoner knyttet til Covid-19. I den sammenheng er det heller ikke kjørt statistikk for å se om det er signifikante forskjeller i TS-nedbrytningen mellom behandlingene. Dette vil bli gjort på et senere tidspunkt når de resterende to parallellene for hvert fôr er ferdig inkubert.

5.5 Forskjeller mellom GP og Daisy i nedbrytning av TS

GP og Daisy viser ulikt resultat for nedbrytning av TS, da TS-nedbrytningen beregnet ut fra gassproduksjonsprøvene gjennomsnittlig viser 2 % ($\pm 5,2$ %) høyere TS nedbrytning for de ulike behandlingene enn de beregnet med Daisy. Det er likevel en relativt høy korrelasjon i TS-fordøyelighet mellom GP og Daisy (0,8) som indikerer at forskjellen er relativt konstant mellom prøvene.

5.6 Økonomiske aspekter og bærekraft

Det beste ernæringsmessige resultatet er muligens ikke det mest økonomiske. Noen midler og enzymer som forbedrer fordøyeligheten er dyre alternativer, og det kan dermed lønne seg økonomisk å benytte et billigere alternativ og heller øke fôrstyrken.

Det er også viktig å tenke bærekraftig, det vil si å utnytte de ressursene som er tilgjengelig på best mulig måte. Det er dermed en balansegang mellom nettopp økonomi og bærekraft. Er det et dårlig år er det kanskje verdt å investere i et dyrere alternativ for å kunne få mer ut av det lille som er, og motsatt om du har mer enn du kan forbruke et år kan du eventuelt gå for et billigere alternativ som gir litt dårligere fôr og heller øke fôrstyrken for å oppnå det samme resultatet.

6. Konklusjon

Ingen av behandlingene pekte seg ut til å være bedre enn noen annen på alle parametere. Valg av ensileringsmiddel (og eventuelt enzymtilsetning) avhenger først og fremst av TS – innholdet på materialet som skal ensileres, og deretter hva som er ønskelige kvaliteter på sluttresultatet, som for eksempel god aerobisk kvalitet og innholdet av WSC.

God aerobisk stabilitet kan oppnås gjennom bruk av ensileringsmidler som inneholder organiske syrer og salter som senker pH og/eller hindrer vekst av uønskede mikroorganismer. Fortørking viste seg også å være svært effektivt for å sikre god aerobisk stabilitet, mens bruk av enzymer generelt førte til lavere aerobisk stabilitet.

Bruk av maursyreholdig ensileringsmiddel ga generelt lavere pH og mer WSC i det ferdig ensilerte surfôret. Enzymer ser ut til å ha en påvirkning på pH, og reduserer andelen NDF og ADF som er igjen etter ensilering. Prøvene tilsatt cellulase (H+C og H+C+X+P) ga en større reduksjon i andelen ADF, NDF og hemicellulose i det ferdig ensilerte surfôret enn resterende enzymbehandlinger, hvorav H+C+X+P ga størst reduksjon. Enzymbehandlingene ga generelt også høyere andel WSC i det ferdig ensilerte surfôret, hvorav kun enzymbehandlingene tilsatt Maursyre 85 % hadde en betydelig økning etter ensilering sammenlignet med kontroll. Fortørking ga redusert gassakkumulering under ensileringsprosessen, samt høyere pH, økt innhold av NDF og ADF, og redusert andel WSC etter ensilering sammenlignet med prøvene med LTS.

Sammenlignet med kontroll hadde enzymbehandlingene generelt høyere TS-fordøyelighet (Daisy), hvorav cellulasebehandlede prøver hadde høyere TS-fordøyelighet enn andre enzymbehandlinger. Fortørking viste seg å gi redusert fordøyelighet av TS. Effekten ulike ensileringsmidlene har på fordøyeligheten av TS varierte derimot mellom våte og fortørkede prøver, ettersom samme ensileringsmiddel ikke hadde samme effekt på vått og fortørket gras. Dette er trolig fordi TS-nivået på graset påvirker fermenteringen og dermed den kjemiske sammensetningen på det ferdig ensilerte fôret.

Verken fortørking eller noen av ensileringsmidlene eller enzymbehandlingene hadde noen bestemt effekt på NDF-nedbrytningen. Likevel skilte spesielt Maursyre 85 % H (5000 U) seg ut med en betydelig høyere nedbrytning av NDF enn resterende enzymbehandlinger. Forskjeller mellom de ulike behandlingene stammer trolig fra andelen av de ulike NDF-fraksjonene som har blitt brutt ned under fermenteringsprosessen.

Verken ensileringsmiddel, enzymer eller fortørking så ut til å direkte påvirke mengden gass som ble produsert under inkuberingen. Resultatene viste likevel en økning i GP med reduserende innhold av aske og råprotein, og økende innhold av WSC i fôret. Forskjellene i GP kommer derfor trolig fra forskjeller i den kjemiske sammensetningen mellom de ulike behandlingene som følge av forskjeller i fermenteringen.

Andelen nedbrutt TS (GP) ser likevel ut til å ha en liten effekt av ensileringsmiddelet som er brukt da prøver tilsatt maursyreholdig ensileringsmiddel generelt har høyere andel nedbrutt, med unntak av GrasAAT Lacto som sammen med Xtrasil Bio Lp er ensileringsmidlene med lavest nedbrytning. Enzymbehandlingene tilsatt Maursyre 85 % har også generelt høyere andel nedbrutt TS enn resterende enzymbehandling.

6.1 Videre arbeid

Denne masteroppgaven presenterer data fra et større forsøk utført i Foods of Norway. Det gjenstår fortsatt å se på gjæringskvaliteten og hygienisk kvalitet for de ulike midlene for å kunne avgjøre hvor godt fôr de ulike ensileringsmidlene og enzymene faktisk produserer. Det gjenstår også å beregne *in vitro* fordøyelighet av råprotein for de ulike surfôrene.

I tillegg gjenstår det å inkubere de to gjenværende replikatene for hver behandling i Ankom gassproduksjonssystemet. Mesteparten av de statistiske analysene vil derfor bli utført på et senere tidspunkt når all data er samlet inn.

7. Referanser

- Anderson, R. (1985). Effect of prolonged wilting in poor conditions on the fermentation quality, metabolisability and net energy value of silage given to sheep. *Animal feed science and technology*, 12 (2): 109-118.
- Andrews, A. H., Blowey, R. W., Boyd, H. & Eddy, R. G. (2008). *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle*: John Wiley & Sons.
- Ankom Technology. (2005). *In Vitro True Digestibility using the DAISY II Incubator* Tilgjengelig fra: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/IVDMD_0805_D200.pdf (lest 26.02.2020).
- Ankom Technology. (2017a). *Acid Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A200 and A200I). ADF Method, Method 5*.
- Ankom Technology. (2017b). *DAISY incubator Operators Manual*
- Ankom Technology. (2017c). *Neutral Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A200 and A200I). NDF Method, Method 6*.
- Ankom Technology. (2018). *ANKOM RF Gas Production System Operator's Manual*
- Bhasker, T. V., Nagalakshmi, D. & Rao, D. S. (2013). Development of appropriate fibrolytic enzyme combination for maize stover and its effect on rumen fermentation in sheep. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 26 (7): 945-951. doi: 10.5713/ajas.2012.12590.
- Bureenok, S., Langsoumechai, S., Pitiwittayakul, N., Yuangklang, C., Vasupen, K., Saenmahayak, B. & Schonewille, J. T. (2019). Effects of fibrolytic enzymes and lactic acid bacteria on fermentation quality and in vitro digestibility of Napier grass silage. *Italian Journal of Animal Science*, 18 (1): 1438-1444.
- Carpintero, C. M., Henderson, A. R. & McDonald, P. (1979). The effect of some pre-treatments on proteolysis during the ensiling of herbage. *Grass and Forage Science*, 34 (4): 311-315. doi: 10.1111/j.1365-2494.1979.tb01483.x.
- Cattani, M. (2011). In situ and in vitro techniques for studying rumen fermentations: methodology and applications.
- Chamberlain, D. G. & Robertson, S. (1992). The effects of the addition of various enzyme mixtures on the fermentation of perennial ryegrass silage and on its nutritional value for milk production in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 37 (3): 257-264. doi: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(92\)90009-U](https://doi.org/10.1016/0377-8401(92)90009-U).
- Christensen, S. & Bratberg, E. (2018). *Ensilering* Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/ensilering> (lest 17.01.2020).
- Crawshaw, R. & Woolford, M. (1979). Aerobic deterioration of silage in and out of the silo. *ADAS Quarterly Review*.
- Dean, D. B., Adesogan, A. T., Krueger, N. & Littell, R. C. (2005). Effect of Fibrolytic Enzymes on the Fermentation Characteristics, Aerobic Stability, and Digestibility of Bermudagrass Silage. *Journal of Dairy Science*, 88 (3): 994-1003. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72767-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72767-3).
- Dehghani, M. R., Weisbjerg, M. R., Hvelplund, T. & Kristensen, N. B. (2012). Effect of enzyme addition to forage at ensiling on silage chemical composition and NDF degradation characteristics. *Livestock Science*, 150 (1): 51-58. doi: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.07.031>.
- Driehuis, F., Wikselaar, P., Vuuren, A. & Spoelstra, S. F. (1997). Effect of a bacterial inoculant on rate of fermentation and chemical composition of high dry matter grass silage. *The Journal of Agricultural Science*, 128: 323-329. doi: 10.1017/S0021859696004157.
- Driehuis, F., Wilkinson, J. M., Jiang, Y., Ogunade, I. & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science*, 101 (5): 4093-4110. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13836>.
- Eurofins. (2018a). *Hygienisk kvalitet i grovfôr til drøvtyggere*. Tilgjengelig fra: <https://cdnmedia.eurofins.com/european-east/media/2709256/hygienisk-kvalitet-paa-grovf%C3%B4r-til-droevtyggere.pdf> (lest 20.01.2020).

- Eurofins. (2018b). *Næringsinnhold i grovfôr til drøvtyggere*. Tilgjengelig fra: <https://cdnmedia.eurofins.com/european-east/media/2848751/naeringsinnhold-i-grovf%C3%B4r-til-droevtyggere.pdf> (lest 05.01.2020).
- Felleskjøpet. (2010). *ENSILERINGSMIDLER til alle forhold*. Tilgjengelig fra: <https://www.fkra.no/getfile.php/Filer/Landbruk/Gj%C3%B8dsel.%20s%C3%A5varer%20og%20ensilering/GrasAAT%20brosjyre%202010.pdf> (lest 19.05.2020).
- Felleskjøpet. (2014). *Xtrasil Bio Lp*. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskjopet.no/planteproduksjon/grovfor/ensilering/biologisk/xtrasil-bio-lp-200gr-18136> (lest 02.01.2020).
- Frei, M. (2013). Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Frutos, P., Hervás, G., Ramos, G., Giráldez, F. J. & Mantecón, A. R. (2002). Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*, 95 (3): 215-226. doi: [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00323-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00323-6).
- Gallardo, I., Bárcena, R., Pinos-Rodríguez, J. M., Cobos, M., Carreón, L. & Ortega, M. E. (2010). Influence of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro and in sacco degradation of forages for ruminants. *Italian Journal of Animal Science*, 9 (1): e8. doi: 10.4081/ijas.2010.e8.
- Garnsworthy, P. C. (2013). *Nutrition and lactation in the dairy cow*: Elsevier.
- Getachew, G., Makkar, H. P. & Becker, K. (2000). Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Br J Nutr*, 84 (1): 73-83.
- Goering, H. K. & Van Soest, P. J. (1970). *Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications*: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Gordon, C. H. (1967). Storage Losses in Silage as Affected by Moisture Content and Structure. *Journal of Dairy Science*, 50 (3): 397-403. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(67\)87434-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(67)87434-4).
- Groot, J. C. J., Cone, J. W., Williams, B. A., Debersaques, F. M. A. & Lantinga, E. A. (1996). Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 64 (1): 77-89. doi: [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7).
- Haavik, T. B. (2017). *Val av ensileringsmiddel og dosering* Norsk Landbruksrådgivning Tilgjengelig fra: <https://vest.nlr.no/fagartikler/val-av-ensileringsmiddel-og-dosering/> (lest 15.02.2020).
- Haigh, P. M. & Parker, J. W. G. (1985). Effect of silage additives and wilting on silage fermentation, digestibility and intake, and on liveweight change of young cattle. *Grass and Forage Science*, 40 (4): 429-436. doi: 10.1111/j.1365-2494.1985.tb01774.x.
- Hansen, C. (2014). *What can a fermentation analysis tell you about your silage?* Tilgjengelig fra: <https://www.dairyglobal.net/Articles/General/2014/12/What-can-a-fermentation-analysis-tell-you-about-your-silage-1647825W/> (lest 26.03.2020).
- Hanse, C., Lorenz, A. & Leon, N. (2010). Cell Wall Composition and Ruminant Digestibility of Various Maize Tissues Across Development. *BioEnergy Research*, 3: 295-304. doi: 10.1007/s12155-010-9100-8.
- Harstad, O. M. (2016). *Grovfôr Ås*: Universitetet for miljø- og biovitenskap (Forelesningsnotat HFE203).
- Henderson, A., McDonald, P. & Woolford, M. (1972). Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass treated with formic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23 (9): 1079-1087.
- Holte, M. (2012). *Effekt av ulike ensileringsmidler på kvaliteten av grassurfôr*. Masteroppgave. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Tilgjengelig fra: <http://hdl.handle.net/11250/186117> (lest 04.06.2020).
- Honig, H. & Woolford, M. K. (1980). *Changes in silage on exposure to air*, Hurley, Berkshire, s. 76-87: British Grassland Society.
- Honig, H. (1991). Reducing losses during storage and unloading of silage. *Landbauforschung Voelkenrode. Sonderheft (Germany, FR)*.

- Huhtanen, P., Kaustell, K. & Jaakkola, S. (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Animal Feed Science and Technology*, 48 (3): 211-227. doi: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90173-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90173-2).
- Huhtanen, P., Rinne, M. & Nousiainen, J. (2007). Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. *Animal*, 1 (5): 758-770. doi: 10.1017/S175173110773673X.
- International Organization for Standardization. (1999). *ISO 6496:1999 Animal feeding stuffs — Determination of moisture and other volatile matter content*.
- International Organization for Standardization. (2002). *ISO 5984:2002, Animal feeding stuffs – Determination of crude ash*.
- International Organization for Standardization. (2008). *ISO 16634-1:2008: Food products - Determination of the total nitrogen content by combustion according to the Dumas principle and calculation of the crude protein content — Part 1: Oilseeds and animal feeding stuffs*.
- Jin, L., Dunière, L., Lynch, J., McAllister, T., Baah, J. & Wang, Y. (2015). Impact of ferulic acid esterase producing lactobacilli and fibrolytic enzymes on conservation characteristics, aerobic stability and fibre degradability of barley silage. *Animal Feed Science and Technology*, 207. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2015.06.011.
- Kung Jr, L., Stokes, M. R. & Lin, C. (2003). Silage additives. *Silage science and technology*, 42: 305-360.
- Kung Jr, L. (2010). *Aerobic stability of silage*. Proceedings of California Alfalfa & Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Conference.
- Kung, L. (1998). *A review on silage additives and enzymes*. Proceedings of the 59th Minneapolis Nutrition Conference.
- Kung, L. & Muck, R. (2015). *Silage additives: where are we going*. Proceedings of the XVII international silage conference, July.
- Kung, L., Shaver, R. D., Grant, R. J. & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101 (5): 4020-4033. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>.
- Kval-Engstad, O. (2005). *Konservering av surfôr*. Tilgjengelig fra: <https://grovfornett.nlr.no/fagartikler/6706/> (lest 19.05.2020).
- Kåss, E. (2019). *in vitro*. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/in_vitro (lest 06.03.2020).
- Lallemand. (2016). *Target pH levels in silage*. Tilgjengelig fra: <https://www.dairyherd.com/article/target-ph-levels-silage> (lest 19.05.2020).
- Lallemand. (u.å.). *Fermentation*. Tilgjengelig fra: <https://qualitysilage.com/make-quality-silage/controlling/fermentation/> (lest 23.01.2020).
- Ling, J. R. (2007). *Dietary protein research trends*: Nova Publishers.
- Makkar, H. P. (2004). Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources-HARINDER PS MAKKAR.
- McDonald, P. (1981). *The biochemistry of silage*: John Wiley & Sons, Ltd.
- McDonald, P., Henderson, N. & Heron, S. (1991). *The biochemistry of silage*: Chalcombe.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. & Wilkinson, R. G. (2011). *Animal nutrition*. 7th ed. utg. Harlow: Prentice Hall.
- Mertens, D. R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 85 (6): 1217-1240.
- Mo, M. & Saue, O. (1988). Recent developments in feed conservation. Proc. 12th General Meeting European Grassland Federation. Dublin, Ireland: 126-142.
- Mo, M. (2005). Surfôrboka (1. utg.). Oslo: Landbruksforlaget, Tun Forlag AS.
- Mo, M. (2006). Trender i ensileringsteknikken—blir framtidens surfôr bedre eller dårligere? Totrinshøsting, spredning, raking, husdyrgjødsel, dosering av ensileringsmiddel, høstkapasitet, entreprenørhøsting, etc.
- Moon, N. J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*, 55 (3): 453-460.

- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C. & Kung, L., Jr. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J Dairy Sci*, 101 (5): 3980-4000. doi: 10.3168/jds.2017-13839.
- Nadeau, E., Buxton, D. R., Russell, J. R., Allison, M. J. & Young, J. W. (2000a). Enzyme, Bacterial Inoculant, and Formic Acid Effects on Silage Composition of Orchardgrass and Alfalfa 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 83 (7): 1487-1502. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75021-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75021-1).
- Nadeau, E., Russell, J. & Buxton, D. (2000b). Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase, inoculant, and formic acid fed to lambs. *Journal of animal science*, 78: 2980-9. doi: 10.2527/2000.78112980x.
- Norgesfôr. (u.å.-a). *GrasAAT® Lacto*. Tilgjengelig fra: <https://www.norgesfor.no/produkter/ensileringsmidler/ensileringsmidler/grasaat/> (lest 02.01.2020).
- Norgesfôr. (u.å.-b). *GrasAAT® Plus*. Tilgjengelig fra: <https://www.norgesfor.no/produkter/ensileringsmidler/ensileringsmidler/grasaat-plus/> (lest 02.01.2020).
- Norgesfôr. (u.å.-c). *GrasAAT® SX*. Tilgjengelig fra: <https://www.norgesfor.no/produkter/ensileringsmidler/ensileringsmidler/grasaat-sx/> (lest 02.01.2020).
- Norgesfôr. (u.å.-d). *Kofasil® LP*. Tilgjengelig fra: <https://www.norgesfor.no/produkter/ensileringsmidler/ensileringsmidler/kofasil-lp/> (lest 02.01.2020).
- Norgesfôr. (u.å.-e). *Kofasil® Ultra*. Tilgjengelig fra: <https://www.norgesfor.no/produkter/ensileringsmidler/ensileringsmidler/kofasil-ultra/> (lest 02.01.2020).
- Norgesfôr. (u.å.-f). *Maursyre 85%*. Tilgjengelig fra: <https://www.norgesfor.no/produkter/ensileringsmidler/ensileringsmidler/maursyre-85/> (lest 02.01.2020).
- Norsk Landbruk. (2019). *Hvor raskt kan du føre med nyhøsta rundballer?* Tilgjengelig fra: <https://www.norsklandbruk.no/husdyr/hvor-raskt-kan-du-fore-med-nyhøsta-rundballer/> (lest 31.01.2020).
- Noziere, P. & Michalet-Doreau, B. (2000). In sacco methods. *Farm animal metabolism and nutrition*: 233-254.
- Oude Elferink, S., Driehuis, F., Gottschal, J. & Spoelstra, S. F. (2000). Paper 2.0: Silage fermentation processes and their manipulation. I: b. 1, s. 17-30.
- Pahlow, G., Muck, R., Driehuis, F., Oude Elferink, S. & Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of Ensiling. I: b. 42, s. p. 31-93.
- Pauly, T. M. & Tham, W. A. (2003). Survival of *Listeria monocytogenes* in wilted and additive-treated grass silage. *Acta Vet Scand*, 44 (1-2): 73-86. doi: 10.1186/1751-0147-44-73.
- Randby, Å. T., Selmer-Olsen, I. & Baevre, L. (1999). Effect of Ethanol in Feed on Milk Flavor and Chemical Composition. *Journal of Dairy Science*, 82 (2): 420-428.
- Randby, Å. T. (2005). Ensileringsmiddel - behov, type og dosering ved ulike tørrstoffnivåer i grasen. *Bondevennen*, 15: 12-14.
- Randby, Å. T. (2010). Hvilken effekt har ensileringsmidler? *Buskap* (5): 28-31.
- Randby, Å. T., Nørgaard, P. & Weisbjerg, M. R. (2010). Effect of increasing plant maturity in timothy-dominated grass silage on the performance of growing/finishing Norwegian Red bulls. *Grass and Forage Science*, 65 (3): 273-286. doi: 10.1111/j.1365-2494.2010.00745.x.
- Ranjit, N. K. & Kung, L. (2000). The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 83 (3): 526-535.
- Rubin, E. M. (2008). *Figure 2: Structure of lignocellulose*.
- Ruud, I. H. S. (2015). *Hvorfor ta fôrprøver?* Tilgjengelig fra: <https://www.bondevennen.no/fagartiklar/hvorfor-ta-forprover/> (lest 26.03.2020).
- Salomonsen, R. (2006a). *Hygienisk kvalitet*: Norsk Landbruksrådgivning. Tilgjengelig fra: <https://grovfornett.nlr.no/fagartikler/6951/> (lest 13.02.2020).

- Salomonsen, R. (2006b). *Surfôr kvalitet - et flertydig begrep*. Tilgjengelig fra: <https://grovfornett.nl.no/fagartikler/6949/> (lest 26.03.2020).
- Selmer-Olsen, I. (2005). *Hvordan unngå mugg i rundballene ?* (lest 26.03.2020).
- Somda, Z., Powell, J., Fernández-Rivera, S. & Reed, J. (1995). *Feed factors affecting nutrient excretion by ruminants and the fate of nutrients when applied to soil*. International Conference on Livestock and Sustainable Nutrient Cycling in Mixed Farming Systems of Sub-Saharan Africa, Addis Ababa (Ethiopia), 22-26 Nov 1993: ILCA.
- Spoelstra, S. F., Van Wixselaar, P. G. & Harder, B. (1992). The effects of ensiling whole crop maize with a multi-enzyme preparation on the chemical composition of the resulting silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60 (2): 223-228.
- Stern, M. D., Bach, A. & Calsamiglia, S. (1997). Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J Anim Sci*, 75 (8): 2256-76.
- Store Norske Leksikon. (2018a). *Rundballe* Tilgjengelig fra: <https://snl.no/rundballe> (lest 17.01.2020).
- Store Norske Leksikon. (2018b). *Silofôr*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/silof%C3%B4r> (lest 17.01.2020).
- Søegaard, K., Hansen, H. & Martin, R. W. (2003). Fodermidlenes karakteristika. I: Hvelplund, T. & Nørgaard, P. (red.) *Kvægets ernæring og fysiologi Bind 1- Næringsstofomsætning og fodervurdering* s. 39-68.
- Thuen, E. & Harstad, O. M. (2016). *husdyrernæring*. Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/husdyrern%C3%A6ring> (lest 05.02.2020).
- Tian, J., Yu, Y., Yu, Z., Shao, T., Na, R. & Zhao, M. (2014). Effects of lactic acid bacteria inoculants and cellulase on fermentation quality and in vitro digestibility of *Leymus chinensis* silage. *Grassland Science*, 60 (4): 199-205. doi: 10.1111/grs.12059.
- Tilley, J. & Terry, R. A. (2006). A Two-Stage Technique for the in vitro Digestion of Forage Crops. *Grass and Forage Science*, 18: 104-111. doi: 10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x.
- Tine Rådgivning og Medlem, Topp Team Fôring & Norsk Landbruksrådgivning. (2013). *Ensiling* Tilgjengelig fra: <https://medlem.tine.no/fagprat/foring/attachment/298287?ts=13e3ff670a6> (lest 07.01.2020).
- Tyrolová, Y. & Výborná, A. (2011). The effects of wilting and biological and chemical additives on the fermentation process in field pea silage. *Czech Journal of Animal Science*, 56 (10): 427-432.
- University of Wisconsin. (2010). *Ensiling* Tilgjengelig fra: <http://corn.agronomy.wisc.edu/Silage/S005.aspx> (lest 18.03.2020).
- Van Vuuren, A. M., Bergsma, K., Frol-Kramer, F. & Van Beers, J. A. C. (1989). Effects of addition of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the in sacco degradation of grass silage. *Grass and Forage Science*, 44 (2): 223-230. doi: 10.1111/j.1365-2494.1989.tb01930.x.
- Volden, H. (2010). *Viktig med nok struktur*: Topp Team Fôring - Tine Rådgivning Tilgjengelig fra: <https://kuforing.wordpress.com/2010/02/01/viktig-med-nok-struktur-2/> (lest 05.02.2020).
- Volden, H. (2011). *NorFor-: The Nordic feed evaluation system*: Springer Science & Business Media.
- Weinberg, Z. G. & Ashbell, G. (2003). Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2): 181-188. doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00130-4](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00130-4).
- Weisbjerg, M. & Hvelplund, T. (2003). Metoder til bestemmelse af kemisk sammensætning og tilgængelighed. I: Hvelplund, T. & Nørgaard, P. (red.) *Kvægets ernæring og fysiologi bind 1 - Næringsstofomsætning og fodervurdering*, s. 69-86.
- Wilkinson, J. M. & Davies, D. R. (2013). The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass and Forage Science*, 68 (1): 1-19.
- Williams, C. C., Froetschel, M. A., Ely, L. O. & Amos, H. E. (1995). Effects of Inoculation and Wilting on the Preservation and Utilization of Wheat Forage. *Journal of Dairy Science*, 78 (8): 1755-1765. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76801-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76801-1).
- Winters, A. L., Fychan, R. & Jones, R. (2001). Effect of formic acid and a bacterial inoculant on the amino acid composition of grass silage and on animal performance. *Grass and Forage Science*, 56 (2): 181-192. doi: 10.1046/j.1365-2494.2001.00265.x.
- Xiccato, G., Bini, R. P., Carazzolo, A., Trocino, A. & Cossu, M. E. (1998). Wilting effect on fermentation characteristics and nutritive value of mountain permanent meadow grass silage.

- Zhang, Q., Li, X., Zhao, M. & Yu, Z. (2016a). Lactic acid bacteria strains for enhancing the fermentation quality and aerobic stability of *Leymus chinensis* silage. *Grass and Forage Science*, 71 (3): 472-481. doi: 10.1111/gfs.12190.
- Zhang, Q., Yu, Z., Yang, H. & Na, R. (2016b). The effects of stage of growth and additives with or without cellulase on fermentation and in vitro degradation characteristics of *Leymus chinensis* silage. *Grass and Forage Science*, 71 (4): 595-606.
- Zhang, Y. C., Wang, X. K., Li, D. X., Lin, Y. L., Yang, F. Y. & Ni, K. K. (2019). Impact of wilting and additives on fermentation quality and carbohydrate composition of mulberry silage. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33 (2): 254-263. doi: 10.5713/ajas.18.0925.
- Zheng, M., Niu, D., Zuo, S., Mao, P., Meng, L. & Xu, C. (2018). The effect of cultivar, wilting and storage period on fermentation and the clostridial community of alfalfa silage. *Italian Journal of Animal Science*, 17 (2): 336-346. doi: 10.1080/1828051X.2017.1364984.
- Ørskov, E. R. (1986). Starch Digestion and Utilization in Ruminants. *Journal of Animal Science*, 63 (5): 1624-1633. doi: 10.2527/jas1986.6351624x.

Vedlegg

Vedlegg 1: Bufferløsninger in vitro; Daisy II inkubator

Bufferløsning A:

KH_2PO_4	10,0 g/liter
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/liter
NaCl	0,5 g/liter
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/liter
Urea	0,5 g/liter

Bufferløsning B:

Na_2CO_3	15,0 g/liter	
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1,0 g/liter	($\text{Na}_2\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,54996 g/liter)

Vedlegg 2: Bufferløsninger in vitro; Ankom Gassproduksjon

Oppskrift fra Ankom Technology (2018) etter metode fra Goering og Van Soest (1970)

Bufferløsning:

NH_4HCO_3	4,0 g/liter
NaHCO_3	35,0 g/liter

Reduserende løsning:

Cysteine • HCl	625,0 mg/100 ml
1N NaOH	4,0 ml/100 ml
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	625,0 mg/100 ml

Mikromineral-løsning:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13,2 g/100 ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10,0 g/100 ml
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0 g/100 ml
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8,0 g/100 ml

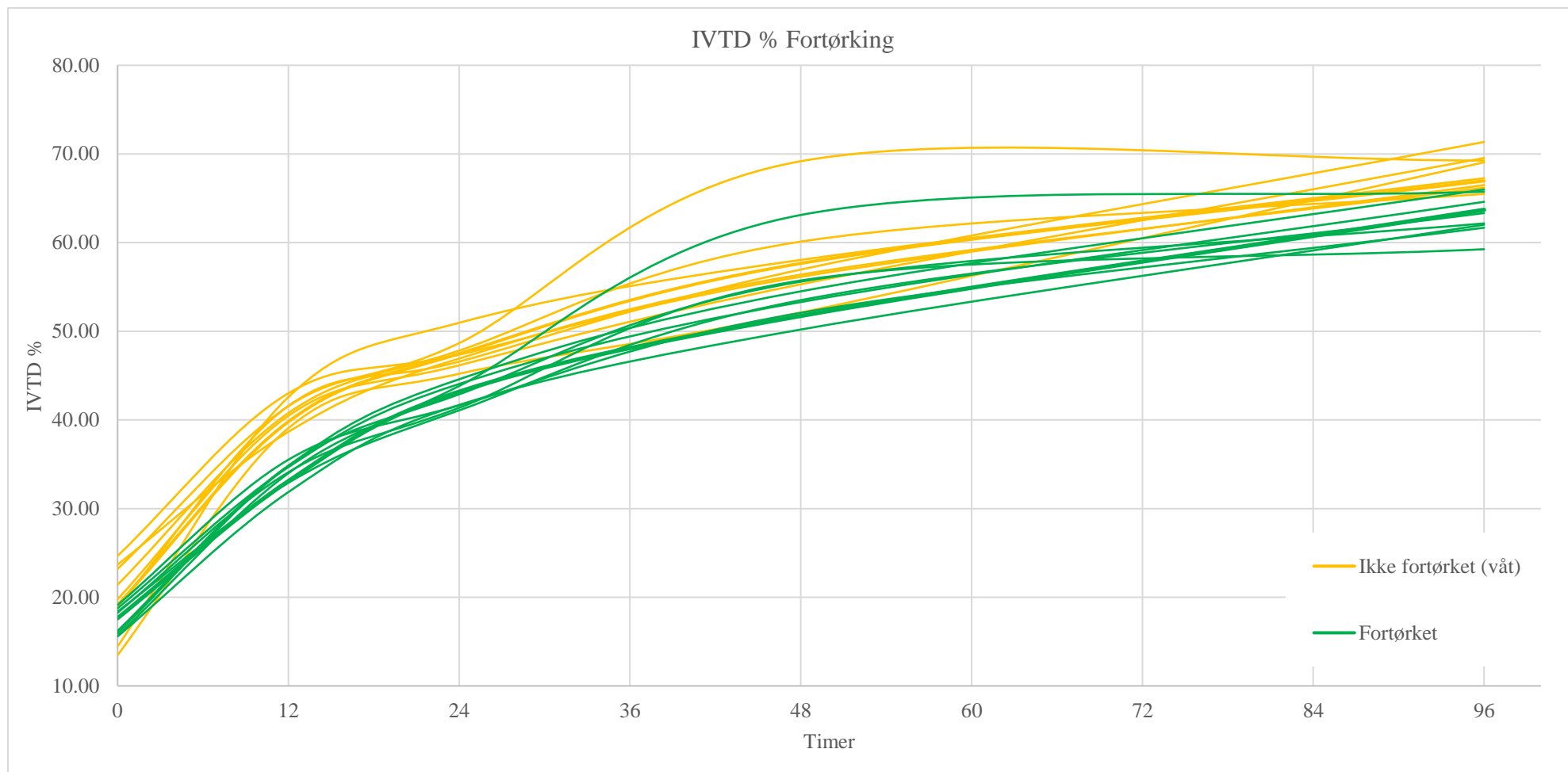
Makromineral-løsning:

Na_2HPO_4	5,7 g/liter
KH_2PO_4	6,2 g/liter
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/liter

Resaruzin:

Resaruzin	0,1 g/100 ml
-----------	--------------

Vedlegg 3: IVTD % (TS basis): Effekt av fortørking



Figur 23: Forskjell i IVTD % mellom våte (gule) og fortørkede (grønne) prøver.

Vedlegg 4: Fordøyelighet av TS og NDF beregnet ved bruk av Daisy II inkubator

Tabell 5: Oversikt over IVTS % (TS basis) for ulike inkuberingstidspunkter for begge paralleller av hver av de 38 behandlingene. I tillegg er andelen nedbrutt aNDFom (%) oppgitt for ulike inkuberingstidspunkter for hver behandling.

Prøve nr.	Parallell	IVTD % TS					Nedbrutt aNDFom (%)				
		0 timer	12 timer	24 timer	48 timer	96 timer	0 timer	12 timer	24 timer	48 timer	96 timer
1	1	24.22	38.84	47.29	58.49	67.59	4.71	6.90	18.92	35.55	52.17
1	2	14.06	40.76	47.65	56.81	66.33					
2	1	25.74	44.14	48.23	55.96	67.30	6.61	12.89	20.64	29.51	49.27
2	2	23.58	41.87	46.49	56.32	65.67					
3	1	23.48	40.10	47.47	60.42	65.65	-2.86	2.30	12.42	32.76	41.25
3	2	19.35	41.45	48.17	59.80	65.32					
4	1	15.72	41.52	50.81	58.55	65.94	4.68	6.18	20.04	30.28	44.59
4	2	13.18	43.62	51.10	57.55	68.57					
5	1	21.76	41.46	49.75	69.23	71.12	3.93	10.84	22.39	53.73	53.19
5	2	24.63	41.63	47.57	69.12	67.39					
6	1	18.90	39.73	47.43	53.65	69.26	-0.55	3.04	14.24	23.09	55.41
6	2	20.67	41.19	44.89	56.94	69.80					
7	1	22.25	39.60	46.12	57.54	65.58	5.97	8.12	18.73	36.33	51.74
7	2	25.12	37.71	47.72	55.23	66.80					
8	1	16.82	41.45	46.42	57.62	71.67	-3.87	5.40	13.76	31.49	55.44
8	2	21.04	41.70	46.73	56.29	71.02					
9	1	11.51	38.03	44.20	50.70	69.66	2.18	5.13	13.97	16.01	54.13
9	2	15.43	40.11	46.22	53.53	68.44					
10	1	23.13	37.94	46.18	56.12	67.12	1.87	3.26	12.97	31.66	48.60
10	2	18.58	39.92	48.54	57.82	63.50					
11	1	19.08	39.09	45.86	57.14	68.74	3.43	6.24	14.03	34.03	52.78
11	2	15.69	38.98	44.12	56.63	66.53					
12	1	27.36	47.58	51.63	69.85	73.58	3.20	6.59	13.69	44.38	49.86
12	2	29.36	44.79	51.76	68.32	72.67					
13	1	23.44	42.23	50.25	67.37	70.67	4.67	4.18	18.10	45.33	54.44
13	2	21.80	40.72	49.74	70.71	69.51					
14	1	19.87	41.96	48.77	53.59	68.14	-0.40	5.86	14.64	23.37	50.98
14	2	21.24	43.55	47.89	52.76	74.24					
15	1	31.77	48.32	53.24	62.89	71.41	1.48	4.94	11.71	28.28	44.81
15	2	32.27	46.76	54.22	63.69	70.03					
16	1	19.81	39.37	48.77	70.12	76.35	2.97	7.95	21.35	56.39	66.72
16	2	16.03	41.24	48.00	65.98	72.06					
17	1	17.77	44.41	52.26	62.06	70.60	4.66	13.41	22.71	38.74	49.51
17	2	20.45	44.47	49.79	58.74	67.62					
18	1	30.42	46.29	51.13	62.75	71.89	2.50	6.30	12.77	30.39	50.74
18	2	31.53	47.09	53.52	60.92	77.13					
19	1	22.19	41.53	49.77	54.95	66.01	3.55	5.59	17.88	28.68	49.15
19	2	26.46	41.35	49.95	58.02	68.10					ved

Prøve nr.	Parallell	IVTD % TS					Nedbrutt aNDFom (%)				
		0 timer	12 timer	24 timer	48 timer	96 timer	0 timer	12 timer	24 timer	48 timer	96 timer
20	1	26.56	43.82	48.15	51.73	71.57	2.11	8.37	15.55	19.06	54.58
20	2	23.59	43.66	49.59	55.31	71.14					
21	1	28.86	50.93	56.85	62.82	75.52	5.80	11.72	19.35	32.46	54.52
21	2	32.24	49.66	56.61	64.52	75.24					
22	1	21.97	39.04	43.32	55.88	69.07	5.09	9.08	9.79	32.03	53.88
22	2	22.20	39.97	46.71	54.54	69.47					
23	1	23.77	41.02	45.77	55.15	64.92	2.61	6.58	15.76	28.26	43.34
23	2	20.47	40.95	46.39	57.16	70.16					
24	1	30.73	44.03	52.13	57.83	70.78	5.57	9.59	17.29	31.21	48.54
24	2	31.29	44.42	50.11	60.49	70.07					
25	1	20.60	39.97	48.10	56.31	68.23	2.50	6.51	16.50	29.54	50.22
25	2	21.15	41.01	48.75	55.46	68.20					
26	1	22.75	39.69	47.94	56.96	66.65	-0.79	3.75	15.74	33.78	48.10
26	2	16.97	38.07	47.71	58.82	67.07					
27	1	18.58	51.71	56.06	60.15	74.90	1.48	7.71	14.91	22.73	54.18
27	2	24.40	50.82	56.35	58.27	74.49					
28	1	17.13	31.90	42.40	54.25	61.81	2.42	7.22	20.63	38.62	49.69
28	2	18.15	34.30	43.96	49.20	65.58					
29	1	21.50	34.41	43.59	52.73	64.39	3.38	8.15	23.07	37.50	53.61
29	2	16.00	34.94	44.51	53.85	64.80					
30	1	16.14	34.27	45.56	54.02	66.63	3.09	8.52	24.09	40.16	57.60
30	2	15.75	35.34	43.61	54.97	65.36					
31	1	18.51	35.31	43.61	65.38	66.15	1.34	8.26	18.70	53.62	54.06
31	2	12.79	32.65	44.04	60.85	65.34					
32	1	21.35	33.81	40.69	52.19	61.00	-0.17	9.51	14.37	35.57	47.85
32	2	16.89	37.21	42.58	51.97	62.34					
33	1	12.83	31.25	39.35	51.22	63.15	-6.95	0.48	11.25	33.13	51.60
33	2	18.33	32.47	44.03	49.16	60.87					
34	1	15.77	35.49	43.18	55.30	60.90	-2.17	7.72	19.90	36.90	45.44
34	2	16.63	34.20	42.59	55.89	63.42					
35	1	16.45	33.26	42.31	53.26	64.35	3.08	8.84	22.06	39.21	54.95
35	2	20.32	32.55	39.85	53.74	62.31					
36	1	19.14	33.74	40.94	53.38	60.41	0.23	0.67	14.32	34.48	44.96
36	2	17.36	34.45	41.79	58.06	58.09					
37	1	12.79	40.56	41.80	51.52	67.27	2.52	12.22	12.91	24.77	52.46
37	2	14.71	39.75	43.19	53.77	67.81					
38	1	13.86	35.08	39.92	50.87	66.55	6.03	13.37	21.59	36.89	60.03
38	2	14.64	34.86	37.96	53.88	66.68					

Vedlegg 5: A, B og C parametere beregnet ut fra gassproduksjonsmetoden

Tabell 6: Oversikt over A, B og C parametere, samt pH og TS-fordøyelighet for alle tre paralleller for hver behandling (1-38). Manglende tall på A, B og C parametere for enkelte prøver kommer av manglende data grunnet komplikasjoner ved inkubering. pH og TS-fordøyelighet er fortsatt målt og beregnet for prøvene med manglende data. TS-fordøyeligheten er beregnet ut fra restfraksjonen som var igjen etter inkuberingen.

Fôr nr.	Parallell nr.	A	B	C	pH	TS-fordøyelighet
1	1	224.89	9.21	1.75	6.327	64.82
1	2	222.17	9.30	1.80	6.342	76.93
1	3	206.72	10.34	1.79	6.337	75.52
2	1	200.11	10.04	1.99	6.470	77.48
2	2	200.44	10.26	1.90	6.477	76.31
2	3	195.47	11.97	1.87	6.480	67.01
3	1	202.10	10.35	1.90	6.481	71.94
3	2	181.42	11.16	2.01	6.482	66.02
3	3	198.76	11.92	1.75	6.503	79.28
4	1	228.38	10.14	1.85	6.454	59.20
4	2	211.21	9.88	2.00	6.459	70.76
4	3	222.34	10.24	1.83	6.460	65.37
5	1	194.19	9.77	1.97	6.492	61.95
5	2	183.43	10.78	2.00	6.499	72.56
5	3	195.77	12.09	1.83	6.493	74.82
6	1	220.68	10.33	1.92	6.426	68.68
6	2	.	.	.	6.381	77.65
6	3	211.60	10.17	1.97	6.462	72.35
7	1	230.08	8.52	1.68	6.332	68.37
7	2	220.23	9.88	1.70	6.350	66.77
7	3	214.67	9.88	1.71	6.362	72.79
8	1	220.16	10.66	1.92	6.437	70.79
8	2	201.92	10.78	1.98	6.465	74.68
8	3	206.03	10.74	2.08	6.459	69.07
9	1	205.29	10.89	2.02	6.449	74.78
9	2	209.34	11.05	1.96	6.458	64.43
9	3	212.93	10.72	2.05	6.449	58.97
10	1	193.67	10.61	2.13	6.459	69.00
10	1	178.84	10.63	2.30	6.473	72.38
10	2	177.90	11.62	2.18	6.492	55.10
11	1	233.59	9.30	1.70	6.309	69.14
11	2	230.84	10.55	1.63	6.324	68.57
11	3	216.75	10.19	1.71	6.327	60.21
12	1	178.00	10.97	2.07	6.492	62.50
12	2	180.57	12.48	1.99	6.499	70.66
12	3	184.18	12.63	1.94	6.504	64.00
13	1	181.84	11.48	2.09	6.483	66.17
13	2	179.67	12.17	2.12	6.490	70.49
13	3	186.01	12.61	2.13	6.486	60.67

<i>Fôr nr.</i>	<i>Parallell nr.</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>pH</i>	<i>TS-fordøyelighet</i>
14	1	227.06	11.18	1.92	6.434	69.30
14	2	.	.	.	6.460	68.75
14	3	195.75	11.49	2.07	6.468	65.65
15	1	193.66	10.70	1.97	6.475	72.79
15	2	187.93	10.34	2.21	6.464	72.41
15	3	196.01	11.13	2.01	6.469	65.28
16	1	188.89	9.75	1.99	6.484	71.65
16	2	189.81	9.51	2.01	6.490	73.17
16	3	190.81	10.32	2.00	6.464	78.90
17	1	202.26	9.46	1.91	6.466	77.46
17	2	214.61	10.05	1.77	6.477	70.80
17	3	206.67	10.50	1.86	6.486	65.99
18	1	224.00	8.26	1.60	6.367	71.69
18	2	218.01	8.97	1.55	6.365	69.73
18	3	228.28	9.80	1.49	6.367	76.08
19	1	232.04	8.44	1.58	6.345	76.83
19	2	227.66	8.89	1.57	6.354	69.56
19	3	226.12	10.05	1.53	6.351	79.98
20	1	232.65	10.64	1.64	6.448	66.82
20	2	226.93	10.42	1.74	6.455	75.30
20	3	248.78	10.23	1.84	6.404	74.75
21	1	248.73	8.26	1.55	6.314	75.78
21	2	218.84	8.87	1.48	6.364	64.50
21	3	225.91	9.29	1.49	6.349	73.31
22	1	205.72	10.06	1.80	6.225	60.89
22	2	.	.	.	6.334	74.80
22	3	208.47	11.20	1.94	6.458	71.71
23	1	196.32	10.39	2.21	6.365	66.18
23	2	209.28	10.91	2.10	6.436	73.40
23	3	.	.	.	6.451	76.83
24	1	211.40	9.17	1.73	6.367	76.61
24	2	199.92	8.87	1.78	6.354	73.38
24	3	220.76	10.34	1.62	6.341	63.09
25	1	240.82	9.19	1.69	6.306	65.29
25	2	218.60	9.40	1.77	6.345	75.29
25	3	214.70	10.24	1.71	6.345	70.43
26	1	180.07	10.87	2.22	6.481	67.90
26	2	184.81	11.41	2.12	6.495	75.09
26	3	183.99	11.88	2.14	6.487	65.35
27	1	200.08	10.90	1.86	6.469	77.48
27	2	184.35	10.56	2.13	6.471	71.90
27	3	203.18	11.11	1.98	6.472	66.03
28	1	211.74	11.67	1.86	6.477	73.13
28	2	204.70	11.72	1.86	6.475	74.22
28	3	208.41	11.37	2.05	6.468	65.19

<i>Fôr nr.</i>	<i>Parallell nr.</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>pH</i>	<i>TS-fordøyelighet</i>
29	1	246.73	9.47	1.63	6.331	72.37
29	2	215.05	10.09	1.65	6.363	67.03
29	3	226.49	10.81	1.52	6.362	68.99
30	1	.	.	.	6.291	75.57
30	2	226.88	10.58	1.56	6.361	74.50
30	3	229.68	10.65	1.49	6.368	62.52
31	1	194.45	10.77	1.94	6.499	68.29
31	2	188.07	11.48	1.95	6.495	60.45
31	3	197.33	12.33	1.90	6.503	69.18
32	1	196.40	10.96	1.90	6.481	77.72
32	2	196.63	12.20	1.88	6.489	73.52
32	3	197.11	12.68	1.85	6.501	67.00
33	1	216.94	9.31	1.78	6.379	64.48
33	2	205.72	9.64	1.68	6.388	76.92
33	3	225.59	10.44	1.63	6.391	70.90
34	1	192.32	11.09	1.94	6.509	62.58
34	2	188.99	11.64	1.86	6.512	63.90
34	3	185.47	12.11	2.03	6.510	69.85
35	1	215.66	9.13	1.75	6.356	66.39
35	2	224.58	10.01	1.69	6.383	66.56
35	3	215.03	10.95	1.60	6.386	65.25
36	1	188.07	11.24	1.95	6.486	63.00
36	2	191.02	11.45	1.95	6.501	70.99
36	3	185.28	13.05	1.95	6.496	66.11
37	1	276.46	8.99	1.67	6.368	77.39
37	2	255.33	8.39	1.70	6.382	71.60
37	3	257.19	8.78	1.65	6.409	71.93
38	1	242.19	10.53	1.69	6.427	74.14
38	2	245.16	10.14	1.75	6.435	65.19
38	3	236.95	9.84	1.78	6.430	73.45

Vedlegg 6: Korrelasjon mellom kjemisk innhold og in vitro data

Tabell 7: Korrelasjon mellom kjemisk innhold og gassproduksjon, TS-fordøyelighet ved bruk av gassproduksjonsmetoden og in vitro samm fordøyelighet av TS ved bruk av Pearson correlation coefficients.

GP(n) = gjennomsnittlig gassproduksjon ved tidsenhet n; TSF72 = TS-fordøyelighet ved 72 timer ved bruk av gassproduksjonsmetoden; Daisy(n) = gjennomsnittlig TS-fordøyelighet ved tidsenhet n ved bruk av Ankom Daisy inkubator; RP = råprotein; NFCee = ikke-fiber karbohydrat pluss eter ekstrakt kalkulert som; 1000-(NDF+RP+aske).

	GP12	GP24	GP36	GP48	GP72	TSF72	Daisy12	Daisy24	Daisy48	Daisy96
Aske	-0.645	-0.786	-0.819	-0.821	-0.828	-0.322	0.297	0.492	0.328	0.264
p-verdi	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u>0.0487</u>	0.0697	<u>0.0017</u>	<u>0.0442</u>	0.1089
NDF	-0.108	-0.057	0.023	0.067	0.123	-0.214	-0.875	-0.835	-0.531	-0.797
p-verdi	0.5205	0.7349	0.8893	0.6887	0.4618	0.1975	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u>0.0006</u>	<u><.0001</u>
ADF	-0.298	-0.287	-0.234	-0.216	-0.195	-0.251	-0.622	-0.533	-0.338	-0.556
p-verdi	0.0696	0.0802	0.1581	0.1938	0.2411	0.1291	<u><.0001</u>	<u>0.0006</u>	<u>0.0381</u>	<u>0.0003</u>
RP	-0.632	-0.740	-0.783	-0.801	-0.817	-0.317	0.247	0.366	0.155	0.255
p-verdi	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	0.0528	0.1343	<u>0.0239</u>	0.3539	0.1229
WSC	0.709	0.845	0.845	0.825	0.802	0.335	0.044	-0.167	-0.108	0.086
p-verdi	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u>0.0397</u>	0.795	0.3167	0.5188	0.6071
NFCee	0.358	0.353	0.288	0.250	0.199	0.339	0.774	0.679	0.452	0.698
p-verdi	<u>0.0274</u>	<u>0.0297</u>	<u>0.079</u>	0.1305	0.231	<u>0.0371</u>	<u><.0001</u>	<u><.0001</u>	<u>0.0044</u>	<u><.0001</u>



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway