



Glycerol till mjölkkor – effekter på våmmetabolismen

Glycerol to dairy cows – effects on the rumen
metabolism

by

Karin Kullberg

Handledare: Kjell Holtenius och Anna Werner

**Institutionen för husdjurens
utfodring och vård**

Examensarbete 254

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

Uppsala 2008

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INNEHÅLLSFÖRTECKNING	1
ABSTRACT	3
INLEDNING	4
LITTERATURSAMMANSTÄLLNING	5
Omställning från sintid till mjölkproduktion – en stor omställning för kon	5
Glycerol och Biodiesel	5
Omsättning av glycerol i våmmen	6
Glycerol som fodertillskott.....	6
MATERIAL OCH METODER	8
Moment 1	8
Djurmaterial	8
Provtagning	8
Moment 2	9
Djurmaterial	9
Provtagning	9
Analyser	10
Beräkning av glycerolförsvinnande från våmmen	10
Statistik.....	11
Etisk prövning	11
RESULTAT	12
Moment 1	12
pH <i>In vivo</i>	12
Osmolalitet <i>In vivo</i>	12
Glycerol <i>In vivo</i>	12
VFA <i>In vivo</i>	12
pH <i>In vitro</i>	13
Osmolalitet <i>In vitro</i>	13
Glycerol <i>In vitro</i>	13
Moment 2	15
pH <i>In vivo</i>	15
Osmolalitet <i>In vivo</i>	15
VFA <i>In vivo</i>	15
Osmolalitet <i>In vitro</i>	15
Glycerol <i>In vitro</i>	16
TS försvinnande <i>In sacco</i>	16
NDF Smältbarhet <i>In sacco</i>	17
Råproteinförsvinnande <i>In sacco</i>	18
DISKUSSION	19
SLUTSATSER	21
SAMMANFATTNING	22
TACK	23
LITTERATURFÖRTECKNING	24

ABSTRACT

Glycerol is essential for the lipid metabolism of both plants and animals. Glycerol is formed in the rumen by hydrolysis of lipids from the feed. Glycerol is also a by-product from the production of biodiesel from rapeseed oil and other fat sources. Glycerol might be used as a dietary glucose precursor for dairy cows in similar ways as propylene glycol. Due to increased production of biodiesel more glycerol has been available to a lower price. There are different qualities of glycerol on the market representing different stages of processing. Crude glycerol also contains water, fat, minerals and methanol while refined glycerol often contains >99.5% glycerol.

This study was divided in two different parts. In the first part three rumen fistulated non-lactating, nonpregnant cows were used. Fractional disappearance of glycerol from the rumen was determined by means of a combination of *in vivo* and *in vitro* methods. Furthermore the effects of glycerol on rumen fluid volatile fatty acids (VFA) concentration and osmolality were analysed. In the second part four rumen fistulated lactating cows received two different glycerol qualities or as a control no glycerol during three two week periods. The effect of the two glycerol qualities on digestibility of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF) and crude protein CP) was determined. Furthermore the effect of the different glycerol qualities on rumen fluid VFA concentration and osmolality was investigated.

Glycerol appeared to be readily absorbed from the rumen and while the digestion rate of glycerol in the rumen was low. The rumen micro flora apparently did not adapt to glycerol since the rate of glycerol digestion was not affected when the cows were fed glycerol for two weeks. Glycerol did not have any marked effect on the digestibility of silage DM, NDF or CP. Glycerol changed the rumen fluid VFA pattern towards more butyrate and less acetate while the effect on propionate varied. The total concentration of VFA rumen fluid was reduced by glycerol. There appeared to be no difference between the two glycerol qualities regarding rumen metabolism.

INLEDNING

Glycerol är ett livsnödvändigt ämne som behövs för att växter och djur ska kunna bilda fett. Glycerol frigörs i våmmen vid mikrobiell hydrolys av växtlipider och andra oljor och fetter som tillförts genom fodret (Paggi et al., 1999; 2004). Glycerol bildas även som restprodukt vid framställning av biodiesel och kan användas som fodertillskott till mjölkkor eller vid behandling av så kallad acetonemi. Acetonemi kan uppstå till följd av en negativ energibalans främst vid tiden efter kalvning och glycerol kan användas för behandling av detta på liknande sätt som andra glukogena substrat som exempelvis propylenglykol. (Rémond et al., 1992; DeFrain et al., 2004; Schröder et al., 1999). Den glycerol som bildas som restprodukt vid framställning av biodiesel är inte helt ren utan innehåller bland annat vatten, oljor, salter och metanol. Dessa ämnen försvinner nästan fullständigt om glycerolfractionen raffinerar.

Tillskott av glycerol har visat sig kunna förändra VFA sammansättningen i våmmen genom att acetatproportionen minskar medan propionat, och butyrat ökar (Reichel et al., 2004; DeFrain et al., 2004; Rémond et al., 1992; Schröder et al., 1999). Südekum (2007) registrerade endast en minskning av acetat och en ökning av propionat. I vissa studier har man funnit att glycerol minskar foderintaget medan studier visar att glycerol inte påverkar foderintaget (Bodarski et al., 2005; Reichel et al., 2004; Ogborn et al., 2004; DeFrain et al., 2004). Glycerol kan ombildas till glukos via glukoneogenesen i levern och kan därmed öka andelen tillgänglig glukos för den högproducerande mjölkkon som annars lätt drabbas av glukosbrist (Sjaastad et al., 2003).

Mitt examensarbete bestod av två delmoment. Syftet med det första delmomentet var främst att se hur stor andel glycerol som omsätts av mikroorganismerna i våmmen och hur stor del som resorberas från våmmen. Under moment två var ett av syftena att se om det finns en tillvänjning för våmmikroberna som gör det lättare för dem att efter en tid omsätta glycerol. Vidare syftade studien till att undersöka hur smältbarheten av fodrets torrs substans, fiber- och råproteinfraktion påverkas vid tillsats av rå- respektive raffinerad glycerol. En annan målsättning var att undersöka hur glycerol, såväl rå- som raffinerad, påverkar VFA sammansättningen i våmvätskan.

LITTERATURSAMMANSTÄLLNING

Från sintid till mjölkproduktion – en stor omställning för kon

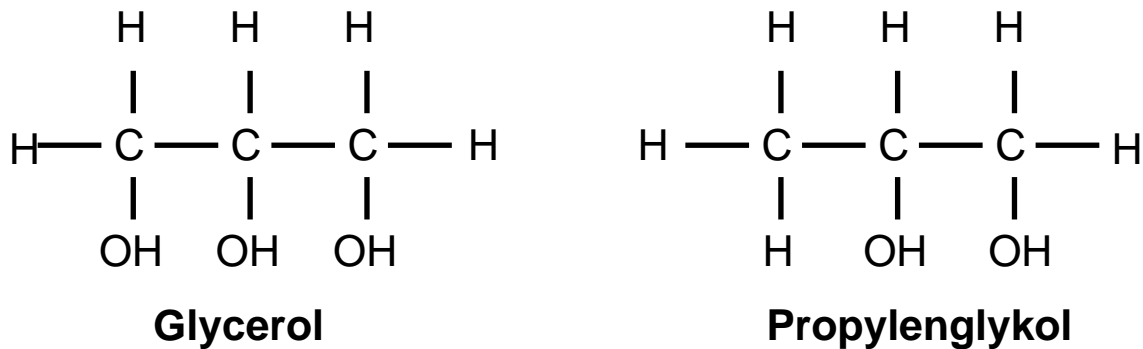
Tiden runt kalvning innebär en omställning i metabolismen hos mjölkkor från sintid till hög mjölkproduktion (Bodarski et al., 2005; Reichel et al., 2004; DeFrain et al., 2004). Det är inte ovanligt att korna, särskilt under tidig laktation, drabbas av acetonemi med foderleda och minskad avkastning som följd. Den primära orsaken till acetonemi är en omfattande negativ energibalans på grund av höga energibehov eller otillräckligt med energi i fodret samtidigt som det inte finns tillräckligt med glukogena substrat i kroppen och fett mobiliseras till ketonkroppar för att ge energi (Sjaastad et al., 2003; Strudsholm et al., 2003). För att minska problemen med acetonemi är det vanligt att korna får tillskott av glykogenastanser tex propylenglykol.

Glycerol och Biodiesel

För djur och växter är glycerol ett naturligt och livsnödvändigt ämne som behövs vid fettinlagring. Energikoncentrationen i glycerol för idisslare är ungefär 14 MJ omsättbar energi (Spörndly, 2007 pers. med.). Glycerol bildas genom mikrobiell hydrolys av växtlipider, oljor och fetter i våmmen (Paggi et al., 1999; 2004). Fermentationen av glycerol sker nästan uteslutande av bakterier av typen *Selenomonas* vilka är en naturlig del av våmmens bakterieflora (Rémond et al., 1992). Forskning kring glycerol som fodertillskott till nötkreatur har gjorts även tidigare men intresset minskade eftersom propylenglykol då var ett billigare alternativ (Rémond et al., 1992). Skillnaden i struktur mellan glycerol och propylenglykol visas i figur 1.

Det finns ett stort intresse för att, som ett alternativ till fossila bränslen, producera biodiesel från förnyelsebara källor som vegetabiliska oljor och animaliska fetter (Fangrui et al., 1999). Vid produktionen bildas glycerol som en biprodukt. Detta skapar ett överskott av glycerol på marknaden vilket lett till att priset på glycerol sjunkit. Det har därmed blivit mer ekonomiskt att använda glycerol som fodertillskott (Bodarski et al., 2005; Reichel et al., 2004; DeFrain et al., 2004; Schröder et al., 1999). Vid framställning av olja motsvarar glycerol 10 % av vikten (Rémond et al., 1992). Rå glycerol innehåller förutom glycerol, bland annat vatten, salter och metanol (Schröder et al., 1999). Enligt Südekum (2007) är det för djurens säkerhets skull viktigt att glycerolen renas från metanol så mycket som är tekniskt möjligt. Detta minskar förutsättningen för att glycerolanvändning ska vara ekonomisk eftersom raffinering för att få bort metanol och andra restprodukter är en kostsam process.

Glycerol är mindre toxiskt i stora mängder än propylenglykol kan vara (DeFrain et al., 2004). Glycerol bildar glukos i glukoneogenesen via trios-fosfat. Andra glukogena substanser, till exempel propylenglykol går in tidigare i glykoneogenesen vilket är mindre effektivt eftersom flera enzymatiska processer krävs för att bilda slutprodukten glukos (Reichel et al., 2004; DeFrain et al., 2004; Bodarski et al., 2005).



Figur 1. Strukturformler för glycerol och propylenglykol.

Omsättning av glycerol i våmmen

Enligt Südekum (2007) fermenteras nästan all tillsatt glycerol i våmmen och propionat bildas. Endast en mycket liten del anses kunna absorberas över våmväggen. I olika studier har man undersökt hur glycerol påverkar sammansättningen av VFA i våmvätska. I studierna har glycerol av skiftande renhet prövats och olika mängd glycerol har givits till djuren. Resultaten har varierat men man tycks vara överens om att glycerol påverkar både koncentrationen och proportionerna av VFA. Glycerol minskade acetatandelen medan propionatandelen ökade (Reichel et al., 2004; DeFrain et al., 2004; Schröder et al., 1999). Schröder et al. (1999) såg dessutom en tydlig ökning av butyrat fyra timmar efter tillsatt glycerol medan Reichel et al. (2004) och DeFrain et al. (2004) endast såg en tendens till ökning av butyratandelen efter tillsatt glycerol. I en grovfoderbaserad foderstat gav glyceroltillskott en minskning av acetat- och ökning av propionat- och butyratandelarna (Paggi et al. 1999). Glycerol minskade den proteolytiska aktiviteten med cirka 20 %. Paggi et al. (2004) jämförde nedbrytning av hö respektive karboxymetylcellulosa vid tillsats av olika glycerolkoncentrationer. Nedbrytningen av hö minskade med mellan 8-15 % vid koncentrationerna glycerolkoncentrationerna 100, 200 och 300 mM. Glycerol minskade också nedbrytningen av karboxymetylcellulosa med mellan 7-17 % vid koncentrationerna 200 och 300 mM. Samtliga effekter i studien nåddes först vid koncentrationer utanför det fysiologiskt normala i våmmen (Paggi et al., 2004).

Glycerol som fodertillskott

De flesta försöken med glyceroltillskott har utförts under tiden precis innan kalvning till några veckor efter kalvning då näringsbalansen åter har stabiliserats. Studiernas syfte har varit att registrera eventuella skillnader i foderintag samt mjölkavkastning och mjölksammansättning efter tillsats av glycerol (Bodarski et al., 2005; Reichel et al., 2004; Ogborn et al., 2004; DeFrain et al., 2004). Bodarski et al. (2005) och Reichel et al. (2004) registrerade ett högre foderintag genom hela försöksperioden medan Ogborn et al. (2004) registrerade ett ökat foderintag före kalvning men en tendens till minskat foderintag efter kalvning. En studie av DeFrain et al. (2004) har fått helt andra resultat. Under studien jämfördes tillskott av en låg och en hög glycerolkoncentration med en kontroll bestående av motsvarande mängd energi i form av stärkelseriikt foder. Resultat från studien visade att glycerol gav ett minskat foderintag före kalvning medan foderintaget efter kalvning inte påverkades. Vid registrering av mjölkavkastning observerade Bodarski et al. (2005) och Reichel et al. (2004) en ökning av avkastningen medan Ogborn et al. (2004) och DeFrain et al. (2004) fann att avkastningen inte påverkades. Bodarski et al. (2005) observerade att en högre dos glycerol gav ett högre

proteininnehåll i mjölken. För Ogborn et al. (2004) tenderade oral tillförsel att minska protein och laktos i mjölken medan DeFrain et al. (2004) såg en minskning av fettinnehåll och energikorrigerad mjölk. Skillnaderna i resultat mellan de olika försöken beror troligtvis på skillnader i fodringssystem (Reichel et al., 2004; DeFrain et al., 2004). Försvinnandehastigheten för glycerol vid stärkelsefermentation och cellulosfermentation studerades av Rémond et al. (1992). Studien utfördes *in vitro* och visade att försvinnandet skedde linjärt och likartat för båda dieterna. Hastigheten ökade vid högre glycerolgiva (Rémond et al., 1992).

MATERIAL OCH METODER

Moment 1

Djurmaterial

I försöket användes tre våmfistulerade kor från från SLU's försöksbesättning vid Kungsängen. De var inte dräktiga eller lakterande. Korna utfodrades med 4 kg hö, 1,25 kg kraftfoder samt halm. Den glycerol som användes under försök 1 innehöll > 99,5 % glycerol.

Provtagning

Alla de tre korna fick en bolusdos som innehöll 500 g glycerol, renhet 99,5 % och 8 g CoEDTA löst i 1000 ml H₂O direkt i våmmen. CoEDTA användes som en markör för våmvätskeflödet ut från våmmen via bladmagsöppningen. Prov från våmvätska togs vid tiderna 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 och 360 min efter bolusdosen. Våmvätskan sögs upp från våmmen med en pvc-slang genom fistellocket med hjälp av vacuumsug till en termos och överfördes sedan till ett 100 ml plaströr. Direkt efter provtagning registrerades vätskans pH innan proverna centrifugerades i 5 min (1800 G). Supernatanten överfördes till eppendorfrör för mätning av osmolalitet. Proverna frystes därefter för senare analys av glycerol; VFA och Co-EDTA. Två respektive tre dagar senare togs våmprover för kontroll från samma kor utan tillsatt glycerol. Kontrollproverna togs varje timme under en sex timmars period. Provernas pH registrerades innan de centrifugerades och frystes för vidare analys av VFA.

För att fastställa hur stor del av glycerolen som omsattes av våmmikroberna gjordes ett *in vitro* försök enligt en metod utvecklad av Udén (2007 pers. med.). Våmvätskan från två av de tidigare använda våmfistulerade korna användes då. Två jäsrör gasades med koldioxid för att vara syrefria (figur 2). Sedan isolerades rören för att hålla värme och transporterades ut till stallet där våmtömning skedde. En sjättedel av våminnehållet, omkring 10 kg, överfördes till de två jäsrören och blandades sedan med 6 l McDougal's buffert innan 140 g glycerol, renhet >99.5 %, blandat med 280 g H₂O tillsattes. Den initiala koncentrationen av glycerol i rören motsvarade koncentrationen i våmmen vid *in vivo* studien. Våminnehållet blandades under 20s med en isborrskonstruktion var femte minut den första timmen och därefter var tionde minut. Prov på våmvätskan togs ut efter 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 och 240 min och pH mättes vid 0, 15, 60, 120, 180 och 240 min.



Figur 2. Gasning av de två jäsrören för att göra dem syrefria.

Moment 2

Djurmaterial

I försöket användes fyra lakterande våmfistulerade kor från försöksbesättningen på Kungsängens Gård i Uppsala. Korna var andrakalvare och äldre och de var i genomsnitt i laktationsvecka 17 (range 10-26 veckor). Foderstaten var under alla delperioder i samma proportioner mellan ensilage och kraftfoder och bestod den första veckan i genomsnitt av 12 kg ts ensilage och 7,5 kg kraftfoder. Alla korna fick tre olika behandlingar och varje behandlingsperiod var två veckor (Tabell 1). Behandlingarna var: kontrollbehandling, behandling med råglycerol samt behandling med raffinerad glycerol. Två gånger dagligen (morgon och kväll) gavs till korna, via fisteln, 250 g glycerol blandat med 200 ml vatten. Den rena glycerolen hade en renhet på > 99,5 % glycerol medan den råa, oraffinerade, glycerolen bestod av 88,1 % glycerol, 9,3 % vatten, 0,9 % aska och 8000ppm metanol.

Korna var uppdelade i två par. Den första perioden var gemensam kontroll för de båda paren och därefter utfördes behandlingar med rå- respektive raffinerad glycerol enligt en change-over modell.

Tabell 1. Försöksuppläggning. Byte av glycerol skedde fredag kväll den 11 och 25 maj.

	Period 1: 27 april - 11 maj	Period 2: 11 maj - 25 maj	Period 3: 25 maj - 8 juni
1192	Kontroll	Raffinerad glycerol	Rå glycerol
1202	Kontroll	Rå glycerol	Raffinerad glycerol
1222	Kontroll	Rå glycerol	Raffinerad glycerol
1227	Kontroll	Raffinerad glycerol	Rå glycerol

Provtagning

På försöksperiodernas tolfte dag utfördes en *in vivo* studie. Våmvätska togs från de fyra korna vid fem tillfällen, innan glyceroltillsats (tidpunkt 0) samt efter 2, 4, 8 och 12 timmar.

Våmvätskan centrifugerades i 5 min (1800 G) innan supernatanten överfördes till eppendorfrör och sparades för analys av osmolalitet. De frystes sedan för kommande analys av VFA.

Samma dag som våmvätska togs ut för *in vivo* studien gjordes även ett *in sacco* försök. Två gånger sex påsar förbereddes med 1,500g ts ensilage för varje ko. Dessutom förbereddes två påsar som tvättades och som utgjorde ”0-värde” för alla fyra korna. Påsarna inkuberades i våmmen under 2, 4, 8, 16, 24 respektive 48 timmar. Påsarna plockades ut, sköljdes två gånger i tvättmaskin och torkades i 45°C i ett torkskåp under ett dygn. Innehållet sparades och mängden TS, NDF och kväve bestämdes vid ett senare tillfälle.

Dagen efter *in vivo* studien utfördes en kompletterande *in vitro* studie av våmvätskan. Våmvätska från de fyra korna hämtades direkt på morgonen och förvarades i 39°C i ett vattenbad. Vätskan silades sedan igenom en dubbel ostduk innan 7 ml mättes upp i tolv förpreparerade rör med 14 ml medium och 1,0 ml reduktionslösning och glycerol motsvarande 4 g glycerol/l för varje ko. Rören skakades försiktigt innan de ställdes in i 39°C inkubationsskåp under skakning. Rören inkuberades i 1, 3, 6, 9, 12 respektive 24 timmar. Inkubationen avbröts genom att rören placerades i 80°C vattenbad under 20 min därefter kylde de ner och centrifugerades i 10 min (1800 G). Supernatanten överfördes till eppendorfrör och sparades för senare analys av osmolalitet och glycerol.

In vivo, *in sacco* och *in vitro* studierna upprepades på samma sätt varje period med undantag av att rören fördubblades vid de två sista *in vitro* studierna.

Analyser

Analyserna utfördes, med undantag för koboltanalyserna på laboratoriet på Kungsängen. Kobolthalten i våmvätskan bestämdes med atomabsorbtionsspektrofotometri vid institutionen för kemi, fakulteten för naturresurser och lantbruksvetenskap, SLU, Uppsala. Inför analyser av osmolalitet, kobolt, glycerol och VFA tinades proverna i kallt vattenbad och centrifugerades sedan 5 min i 13000 RPM.

Osmolaliteten i proverna bestämdes med hjälp av fryspunktsnedsättning (Advanced Osmometer modell 3250). Instrumentet kalibrerades med en lösning på 290 mOsm innan användning.

Glycerolanalyserna utfördes i duplikat med spektrofotometrisk UV-metod (Roche´s testkit för bestämning av glycerol i foder och andra material). Absorptionen mättes vid 340nm.

Analyserna av NDF utfördes enligt ”amylase neutral detergentfiber method organic matter”.

Halten av råprotein bestämdes med en Kjeldahlmetod.

Koncentrationen av VFA i våmvätska bestämdes med en HPLC metod (Andersson och Hedlund, 1983).

Beräkning av glycerolförsvinnande från våmmen

Glycerol kan antas försvinna från våmmen på tre olika sätt; genom mikrobiell digestion, resorption över våmepitelet samt genom avflöde via bladmagsöppningen. Genom att

kombinera resultaten från *in vivo* och *in vitro* studierna kan det relativa glycerolförsvinnandet beräknas för tre olika vägar. Avflödet från våmmen till löpmagen antogs följa avflödet av vätska från våmmen och följa 1:a ordningens kinetik. Avflödet bestämdes genom att plotta de logaritmerade värdena för koboltkoncentrationen i våmvätskeproverna mot tiden för respektive provtagningstillfälle. Lutningen av den räta linjen motsvarar det fraktionella avflödet från våmmen. Den mikrobiella digestionen av glycerol i *in vitro* systemet antogs också följa första ordningens kinetik. Slutligen beräknades hastigheten med vilken glycerol försvann *in vivo* enligt samma kinetiska principer. Glycerolupptaget från våmmen förutsattes motsvara det totala glycerolförsvinnandet från våmmen minus den från *in vitro*-systemet beräknade mikrobiella omsättningen av glycerol samt det beräknade avflödet av glycerol från våmmen via bladmagsöppningen.

Statistik

Vid de statistiska beräkningarna av data från delförsök 2 användes proceduren General Linear model (Mintab release 14). Fixa effekter var ko, tid och behandling i alla beräkningar utom för pH beräkningarna där ko och behandling var fixa effekter. Parvisa jämförelser testades enligt Tukeys metod.

Etisk prövning

Försökets var godkänt av Uppsala djurförsöksetiska nämnd

RESULTAT

Moment 1

pH *In vivo*

Efter tillsatt glycerol varierade pH mycket framför allt för ko nummer 665 och 973. Dessa två fick en kraftig sänkning vid 120 minuter medan samma tid innebar en höjning för ko nummer 971. Vid kontrollprovtagningen varierade ko nummer 973 fortfarande i pH medan det för nummer 665 och 971 var mer stabilt. (Vid två tidpunkter misslyckades provtagningen på ko nummer 971) (Tabell 2).

Tabell 2. pH i våmvätska.

Tid (min)	Kontroll			Glycerol		
	Ko 665	Ko 971	Ko 973	Ko 665	Ko 971	Ko 973
0	6,58	6,99	6,43	6,57	6,57	6,27
30	6,54	6,87	6,84	6,27	6,78	6,67
60	6,62	-	6,46	6,78	6,41	6,32
120	6,62	-	6,47	6,67	6,35	6,43
180	6,65	6,98	6,4	6,3	6,32	6,27
240	6,67	6,9	6,19	5,74	6,72	6,13
300	6,69	6,89	6,78	6,09	6,68	5,78
360	6,54	6,94	6,62	6,57	6,48	6,09

Osmolalitet *In vivo*

Osmolaliteten mättes endast efter tillsatt glycerol och inte efter kontrollprovtagningen. Glycerol gav som väntat en höjning av osmolaliteten från i genomsnitt 298 mOsm till 464 mOsm efter tillsatt glyceroldos och sjönk därefter hos alla kor tills utgångsläget nåddes igen efter ungefär två timmar. Från två timmar och fram till provtagningens slut förändrades inte osmolaliteten. Ko nummer 665 sågs dricka en kort stund efter given dos.

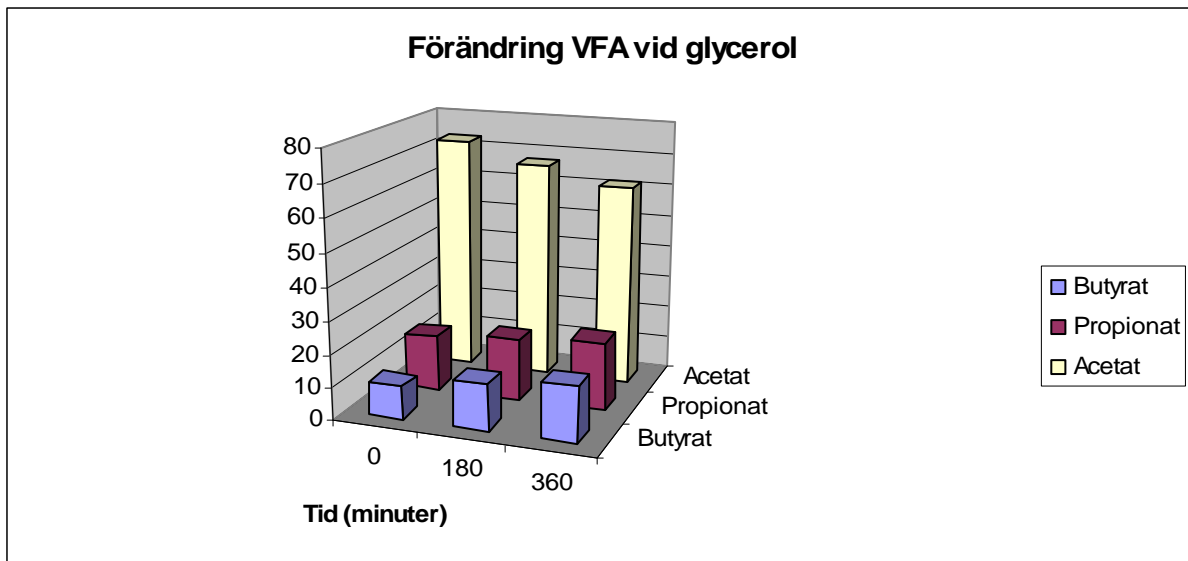
Glycerol *In vivo*

Som väntat stiger glycerolkoncentrationen efter tillsatt bolusdos med glycerol. Hos två kor vände kurvan efter den första provtagningen medan den tredje kon visade en dal och topp innan kurvan kontinuerligt sluttade nedåt. Vid tiden 360 minuter var koncentrationen nere på utgångsläget för de två första korna.

VFA *In vivo*

Då de tre korna uppvisade samma mönster i VFA sammansättningen redovisas förändringen i proportionerna mellan fettsyrorerna vid kontroll och glyceroltillsats med ett medelresultat från de tre korna vid tre tidpunkter. Glycerol medförde en sänkning av acetatandelen medan framför allt butyrat- men även för propionatandelen ökande. Proportionerna förändras från 73:17:10 (acetat:propionat:butyrat) vid tidpunkt 0 till 67:19:14 vid tiden 180 min och till

62:21:17 efter 360 min (Figur 3). 360 min efter tillsatt glycerol hade den totala andelen VFA sjunkit med ca 2 %.



Figur 3. Förändring av proportioner i VFA *in vivo* efter tillsatt glycerol.

pH *In vitro*

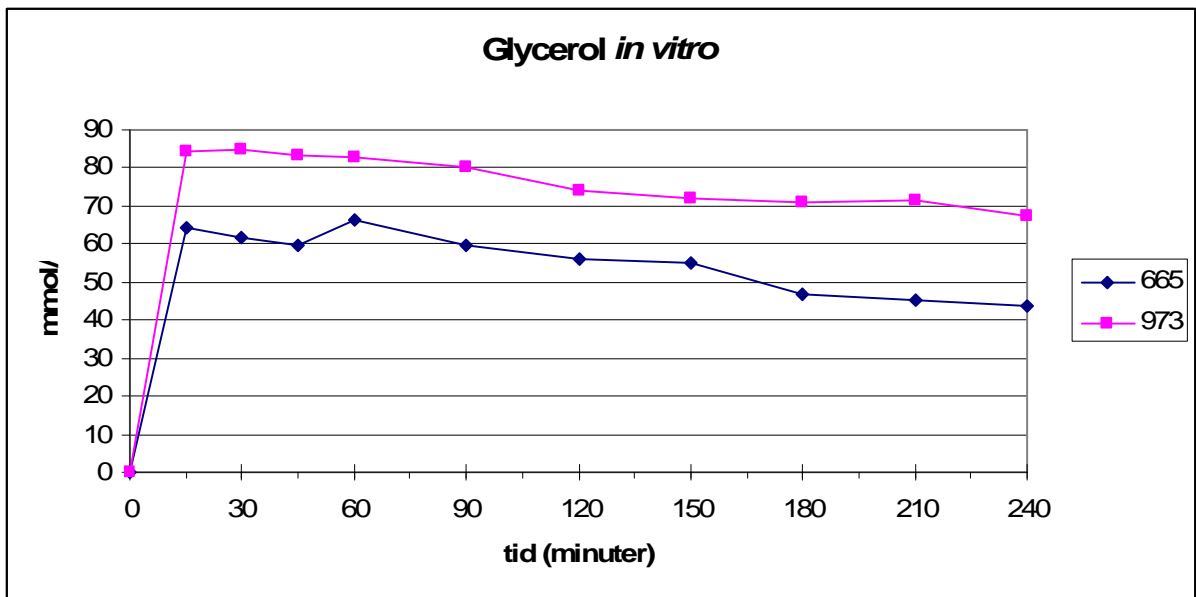
Under *in vitro* försöket enligt metoden utvecklad av Udén (2007, opublicerad) omsattes glycerol endast genom mikrobiell aktivitet. pH påverkades inte som hos djuret av salivinflöde respektive resorption av fettsyror. Båda de använda korna hade likartad sänkning av pH. Högsta värde (omkring pH 6,8) registrerades innan tillsättning av glycerol och lägsta värde (omkring pH 6,2) uppmättes efter fyra timmar, vid provtagningens sista mätning.

Osmolalitet *In vitro*

Utan avflöde till löpmage eller absorption över våmepitelet vid *in vitro* försöket enligt metod av Udén (2007 pers. med.) medförde tillsatsen av glycerol en kvarvarande höjning av osmolaliteten. En ytterst liten tendens till sänkning av osmolaliteten från i genomsnitt 392 mOsm/l efter glyceroldos till 386 mOsm/l efter fullföljd provtagningstid (fyra timmar) syntes.

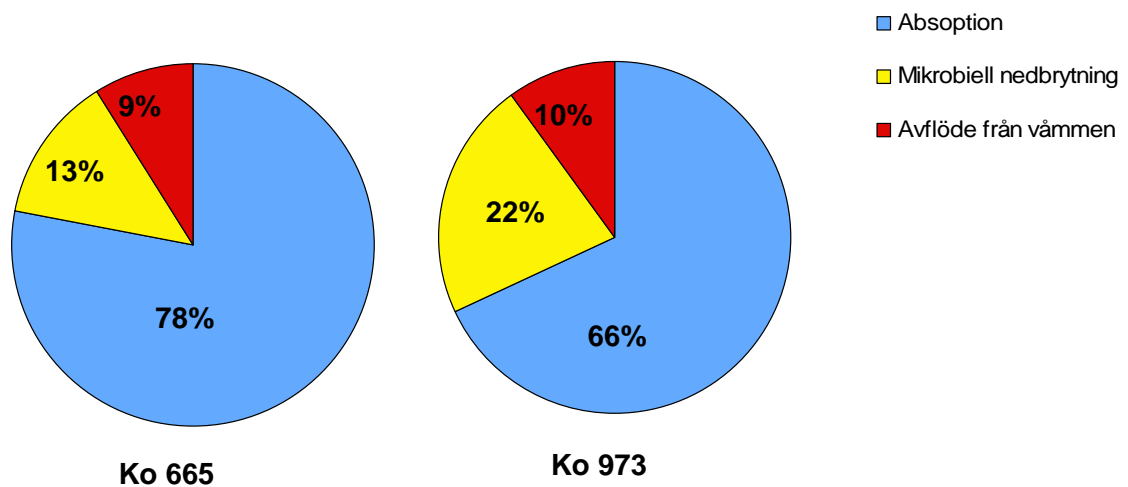
Glycerol *In vitro*

Vid studien av glycerol *in vitro* förutsattes att hela försvinnandet av glycerol ske genom mikrobiell omsättning. De båda kornas glycerolkoncentrationer var olika höga till följd av olika volym våminnehåll men omsättning följde samma mönster i båda fallen (figur 4).



Figur 4. Våmmikrobernas glycerolomsättning *in vitro*.

Glycerolförsvinnandet från ko nummer 665 och 973 varierade något i resultat men hos båda korna absorberades omkring 2/3 av glycerolen över våmepitelet (figur 5).



Figur 5. Differentiellt glycerolförsvinnande från våmmen på två kor.

Moment 2

pH *In vivo*

Alla fyra kor följde samma mönster där perioden med rå glycerol gav en något högre pH-serie och kontrollperioden gav den lägsta pH-serien. Ingen signifikant skillnad mellan behandlingarna detekterades.

Osmolalitet *In vivo*

Tre av fyra kor följde samma mönster avseende osmolaliteten vid de tre behandlingarna. Den fjärde kon avvek vid kontrollbehandling och behandling med raffinerad glycerol. Avvikningarna var inte signifikanta.

VFA *In vivo*

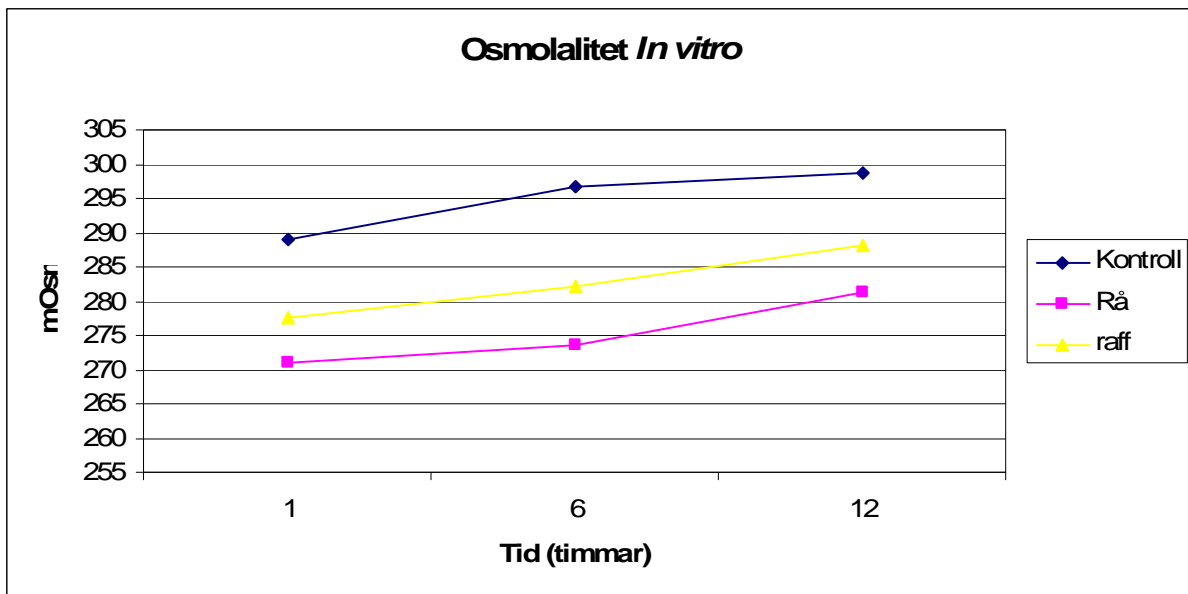
Prov för VFA togs en gång per behandling, fyra timmar efter tillsatt glycerol. För acetat fanns ingen behandlingseffekt medan det för propionat och butyrat var en signifikant skillnad vid tillsats av rå- respektive raffinerad glycerol. Vidare syns ingen skillnad mellan rå glycerol och raffinerad glycerol (Tabell 3).

Tabell 3. VFA koncentrationen *in vivo* vid de tre behandlingarna.

	Kontroll	Rå	Raffinerad	SEM
Total mmol/l	138.7 ^a	105.3 ^b	107,5 ^b	5.962
Acetat %	67.8	66.5	66.25	0,84
Propionat %	20.25 ^a	17.00 ^b	16.50 ^b	0.449
Butyrat %	12.00 ^a	16.25 ^b	17.00 ^b	0.795

Osmolalitet *In vitro*

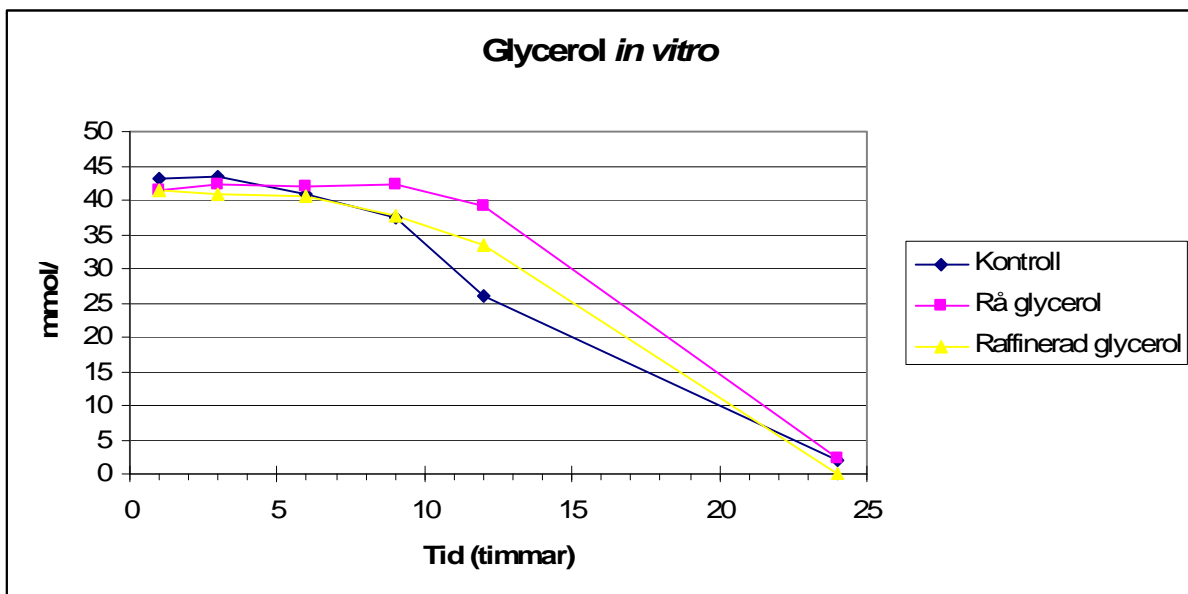
In vitro studien av osmolalitet visar att det finns signifikanta skillnader båda mellan korna och mellan behandlingarna. Ko 1202 hade lägre osmolalitet än de övriga och den fluktuerade runt samma koncentrationsnivå. Ko 1227 hade en lägre osmolalitet vid behandling med raffinerad glycerol men skillnaden var inte signifikant. Kor som utfodrats med glycerol hade lägre osmolalitet i våmvätska än kontrollkorna (figur 6).



Figur 6. Genomsnittliga osmolaliteten vid *in vitro* studien.

Glycerol *In vitro*

Omsättningen av glycerol *in vitro* följer samma kurva vid alla tre behandlingarna och behandlingen med rå glycerol skiljer sig signifikant ($p < 0,05$) från de övriga två behandlingarna. Figur 7 visar den genomsnittliga omsättningen av glycerol från dubbelprover hos de fyra korna.

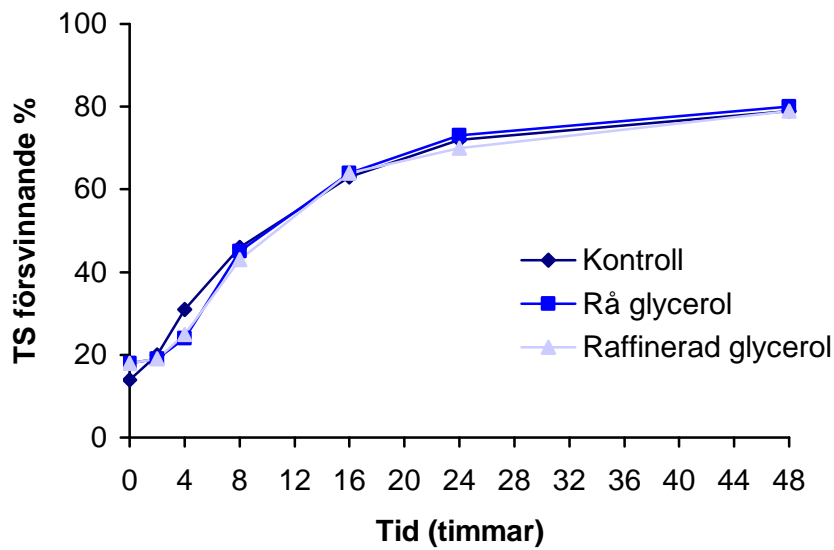


Figur 7. Genomsnittlig omsättning av glycerol vid *in vitro* studien.

TS försvinnande *In sacco*

Under *in sacco* studien delades korna upp i två grupper enligt behandling och resterna blandades från de två korna innan analys utfördes, de följande figurerna redovisar genomsnittet för de båda grupperna. TS försvinnande följde samma kurva för behandlingarna

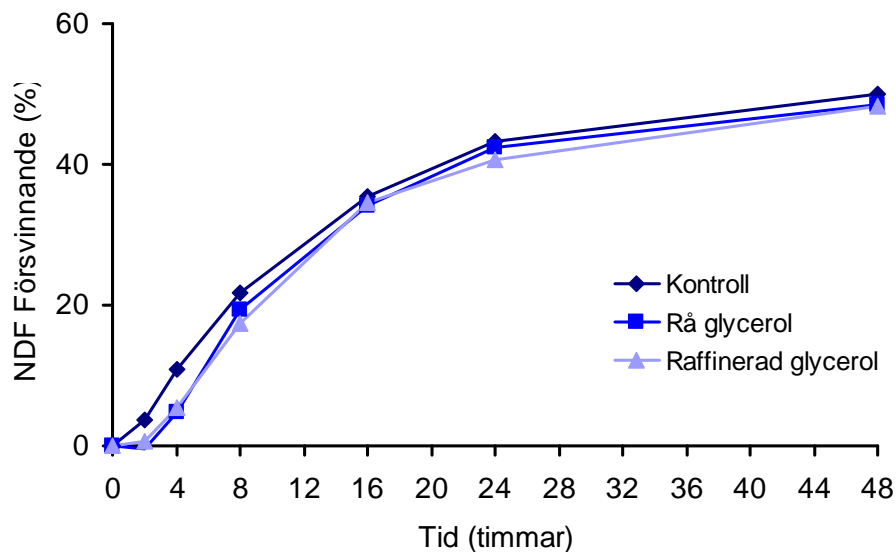
med rå och raffinerad glycerol. Vid de sista tre provtagningarna föll även kontrollbehandlingen in i samma kurva (figur 8).



Figur 8. Genomsnittligt försvinnande av TS från ensilage inkuberat i våmmen angivet i procent av tvättat 0-prov. Data presenterat som minsta kvadratmedelvärden N=4 kor

NDF Smältbarhet *In sacco*

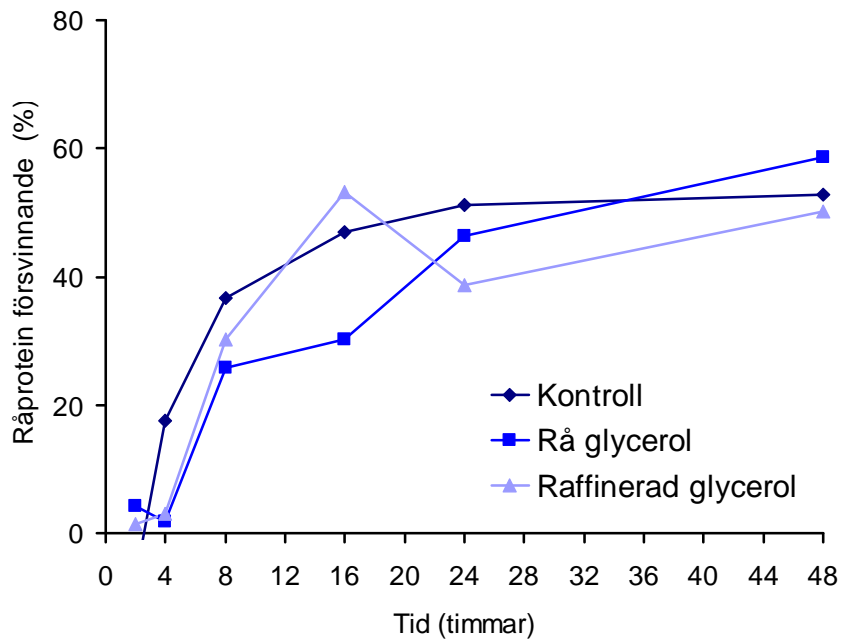
Smältbarheten för NDF följer samma kurva för alla behandlingarna utom vid tidpunkten 4 timmar då kontrollbehandlingen hade något högre smältbarhet än glycerolbehandlingarna (figur 9).



Figur 9. Genomsnittligt försvinnande av NDF från ensilage inkuberat i våmmen angivet i procent av tvättat 0-prov. Data presenterat som minsta kvadratmedelvärden N=4 kor

Råproteinförsvinnande In sacco

Kontrollbehandlingen följer en jämn kurva under hela försökstiden medan behandlingarna med rå respektive raffinerad avviker från kurvan vid tiden 16 timmar. Inga signifikanta skillnader observerades. (figur 10).



Figur 10. Genomsnittligt försvinnande av råprotein från ensilage inkuberat i våmmen angivet i procent av tvättat 0-prov. Data presenterat som minsta kvadratmedelvärden N=4 kor

DISKUSSION

Resultatet av studien av de kor som inte var lakterande visade att omkring två tredjedelar av glycerolen absorberades över våmepitelet vilket är positivt för glycerol som fodertillskott då en stor del blir tillgänglig för glukoneogenesen och kan omvandlas till glukos och blir tillgänglig för mjölkproduktionen. I motsats anser Südekum (2007) att endast små mängder glycerol kan resorberas från våmmen. Ytterligare studier behövs för att verifiera resultatet att en stor andel glycerol resorberas från våmmen.

Vid försöket med de fyra lakterande korna har osmolalitet och pH vid alla provtagningarna samma mönster med högst osmolalitet vid första provtagningstidpunkten och samtidigt lägst pH vilket kan förklaras med att första provtagning alltid utfördes precis efter att korna fått foder. Det är svårt att avgöra om glycerolen har påverkat osmolalitet och pH eller om det är det samtidiga foderintaget som ger störst påverkan av resultatet. En glyceroltillsats vid ett annat tillfälle än kopplat till fodergivan skulle kunna ge ett annorlunda resultat.

Det andra momentet, *in vitro* studien av glycerol, startade omkring kl. 08.00 och pågick därefter med brytningar under de 24 nästföljande timmarna. Mellan den näst sista provtagningen kl. 20.00 och den sista kl. 08.00 nästföljande dag sjönk glycerolhalten påtagligt. Den mikrobiella omsättningen av glycerol ökade inte när mikrofloran hade möjlighet att adapteras till glycerol genom att utfodra korna med glycerol under 12 dagar innan provtagningen. En anledning till den långsamma nedbrytningen i början kan vara att glycerolkoncentrationen var så hög att den på något sätt hämmade nedbrytningen. Intressant vore att se försvinnandet vid flera tidpunkter mellan dessa vilket skulle kunna göras genom att starta försöket på kvällen och ha första brytningen efter tolv timmar och därefter med ett jämnt mellanrum. Ett annat alternativ skulle kunna vara att starta med en lägre koncentration av glycerol i proverna då den lägre koncentrationen inte behöver lika lång tid på sig att försvinna.

Denna studie tyder inte på några tydliga skillnader mellan rå- och raffinerad glycerol i hur de påverkar våmmetabolismen. VFA-mönstret i våmvätska skiljde sig delvis från resultaten från tidigare studier (Rémond et al., 1992; DeFraire et al., 2004; Schröder et al., 1999). Glyceroltillskott, rå- respektive raffinerad, höjde butyratkoncentrationen medan propionat- och acetatkoncentrationerna minskade hos de lakterande djuren. Prover för VFA-analys togs endast vid ett tillfälle under de tre olika perioderna. I moment 1 analyserades effekter av glyceroltillförsel på VFA halten i våmmen hos underhållsutfodrade kor. Glycerol medförde en sänkning av acetatandelen medan framför allt butyrat- men även för propionatandelen ökade. I en annan studie togs upprepade våmprover för VFA-analys hos kor som fick en konstantinfusion av glycerol i våmmen (Werner, 2007 pers. med.). Även i denna studie ökade andelen butyrat men det var relativt små förändringar i andelarna propionat och acetat. Det skulle vara intressant att studera hur VFA halterna i våmmen förändras över en dag efter tillsats av glycerol.

Tillsats av glycerol påverkade inte märkbart smältbarheten av ensilageprovets torrs substans, fiber- och råproteinfraktioner. Sammanlagt fick korna glycerol i fyra veckor varav de i två veckor gavs ren glycerol och två veckor rå glycerol. Kanske skulle resultatet sett annorlunda ut om korna i alla fyra veckorna eller längre tid tilldelats rå glycerol vilket kan vara intressant att undersöka i en annan studie. I den här studien undersöktes endast nedbrytningen av ensilage och fortsatta studier bör undersöka fler fodermedel innan det går att avgöra om

glycerol är ett bra fodertillskott. Eftersom det inte var några skillnader mellan de två glycerolkvaliterna verkar inte vara nödvändigt att glycerolen genomgår en kostsam rening innan den utnyttjas som fodertillskott till mjölkkor. Mjolkproducenterna inte behöver alltså inte köpa den dyrare raffinerade glycerolen.

I denna studie har vi inte tittat på förändring av mjölkavkastning eller mjölkkomposition eftersom det var så få djur som ingick i studien.

SLUTSATSER

- Studien visade att endast omkring 10 % av glycerolen omsattes av våmmikroberna, medan den största delen, omkring två tredjedelar resorberades över våmepitelet .
- Omsättningshastigheten för glycerol påverkades inte när mikroorganismerna var tillvanda att hantera glycerol
- Glyceroltillskott medförde att butyratandelen i våmvätska ökade. Effekterna på acetat- och propionatandelarna var däremot inte entydiga. Inga signifikanta skillnader noterades mellan rå- respektive raffinerad glycerol avseende VFA-sammansättningen.
- Smältbarheten av ett ensilageprovs torrsubstans, fiber- och råproteinfraktion påverkades inte nämnvärt av vare sig av rå- eller raffinerad glycerol.

SAMMANFATTNING

Glycerol är ett livsnödvändigt ämne som behövs för att växter och djur ska kunna lagra in fett. Glycerol bildas naturligt i våmmen vid nedbrytningen av foderlipider men kan också fås som restprodukt vid framställning av biodiesel. Glycerol kan användas på liknande sätt som propylenglykol och är ett ekonomiskt intressant alternativ på grund av det ökade intresset för biodiesel som medför att stora mängder glycerol, som bildas som biprodukt vid biodieselproduktionen, blir tillgängligt på marknaden. Den råa glycerolen innehåller bland annat vatten, oljor och salter och metanol men kan renas så att dessa ämnen nästan fullständigt försvinner.

Materialiet som legat till grund för studiens resultat kommer från provtagning av tre våmfistulerade sinkor samt fyra våmfistulerande lakterande kor från försöksbesättningen på Kungsängens Gård, Uppsala. Studien delades upp i två moment och *in vivo*, *in vitro* och *in sacco* metoder användes. Våmprover togs efter tillsats av olika mängd samt olika renhet av glycerol och analyserades för kobolt, glycerol, osmolalitet och VFA. Från *in sacco* studien kunde det inkuberade ensilageprovets smältbarhet av torrsubstans fiber- och råproteinfraktion bestämmas.

Av den tillsatta glycerolen resorberades omkring 2/3 över våmepitelet. Inga speciella skillnader kunde hittas mellan rå- respektive raffinerad glycerol jämfört med kontroll utan glycerol vare sig i våmmens VFA sammansättning eller i smältbarheten för fodrets torrsubstans, fiber- och råproteinfraktion.

TACK

Jag vill tacka alla personer som har hjälpt mig under tiden som jag har arbetat med mitt examensarbete. Stallpersonalen på Kungsängens gård för all hjälp med kornas glycerolgivor. Laboratoriepersonalen som har hjälpt mig med mina analyser och till sist tack till mina handledare Kjell Holtenius och Anna Werner för all hjälp.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Andersson, R. and Hedlund, B. 1983. *HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 176:440-443.
- Bodarski, R., Wertelecki, T., Bommer, F. and Gosiewski, S. 2005. *The Changes of Metabolic Status and Lactation Performance in Dairy Cows under Feeding TMR with Glycerin (Glycerol) Supplement at Periparturient Period*. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Volume 8, Issue 4.
- DeFrain, J.M., Hippen, A.R., Kalscheur, K.F. and Jardon, P.W. 2004. *Feeding Glycerol to Transition Dairy Cows: Effects on Blood Metabolites and Lactation Performance*. J. Dairy Sci. 87:4195-4206. American Dairy Science Association.
- Fangrui, M. and Milford A., H. 1999. *Biodiesel production: a review*. Biosource Technology 70 (1999) 1-15.
- McDonald, P., Edwards, RA., Greenhalgh, JFD. and Morgan, CA. 2002. *Animal Nutrition*. Sixth ed. Ashford Colour Press, Gosport.
- Minitab release 14.1. 2003. Minitab Inc.
- Ogborn, K.L., Paratte, R., Smith, K.L., Jardon, P.W. and Overton, T.R. 2004. *Effects of method of delivery of glycerol on performance of dairy cows during the transition period*. J Anim. Sci. Vol. 82, Suppl. 1.
- Paggi, R.A., Fay, J.P. and Fernández, H.M. 1999. *Effect of short-chain acids and glycerol on the proteolytic activity of rumen fluid*. Animal Feed Science and Technology 78 (1999) 341-347.
- Paggi, R.A., Fay, J.P. and Faverin, C. 2004. *In vitro ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol*. Journal of Agricultural Science (2004), 142, 89-96.
- Reichel, P., Hybsky, S., Kovac, G., Zavadova, Z., Huska, M. and Paulikova, I. 2004. *Feeding glycerol to transition dairy cows: Effects on rumen fluid, blood metabolites and lactation performance*. 2nd Clinical Department of Internal Diseases. The University of Veterinary Medicine. Kosice. The Slovak Republic.
- Rémond, B., Souday, E. and Jounay, J.P. 1992. *In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes*. Animal Feed Science and Technology, 41 (1993) 121-132.
- Sjaastad, Ø V., Hove, K. and Sand, O. 2003. *Physiology of Domestic Animals*. Scandinavian Veterinary Press.
- Schröder, A. and Südekum, K-H. 1999. *Glycerol as a by-product of biodiesel production in Diets for ruminants*. Institute of Animal Nutrition, Physiology and Metabolism, University of Kiel. Germany.
- Spörndly, R. 2007. Personligt meddelande. Sveriges lantbruksuniversitet.

Strudsholm, F. og Sejrsen, K. 2003. *Kvægets ernæring og fysiologi. Bind 2 – Fodring og production*. DJF rapport. Hysdyrbrug nr. 54. Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri. Danmarks JordbrugsForskning.

Südekum, K-H. 2007. *By-products from biodiesel production: glycerine and rapeseed products in ration for farmanimals*. Institute of animal science, University of Bonn. Germany.

Udén, P. 2007. Personligt meddelande. Sveriges lantbruksuniversitet.

Werner, A. 2007. Personligt meddelande. Sveriges lantbruksuniversitet.