

Skattning av fibersmältbarhet med ligninanalyser

Dan-Axel Danielsson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för tillämpad husdjursvetenskap och välfärd,

Michael Murphy, Lantmännen,

Junko Takahashi Schmidt, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för skoglig genetik och växtfysiologi,

Annie Larsson, Lantmännen,

Elisabet Nadeau, <https://orcid.org/0000-0001-7430-2122>, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för tillämpad husdjursvetenskap och välfärd

Utgivare: Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för tillämpad husdjursvetenskap och välfärd
Utgivningsår: 2025
Utgivningsort: Skara
Serietitel: Rapporter från institutionen för tillämpad husdjursvetenskap och välfärd
Delnummer i serien: 9
ISSN (Online): 2004-934X
ISBN (elektronisk version): 978-91-8046-600-4
DOI: <https://doi.org/10.54612/a.1fapm7j52e>
Nyckelord: fibersmältbarhet, lignin, guaiacyl, syringyl, *p*-hydroxyfenyl, hydroxykanelnsyra, kumarsyra, ferulinsyra, gräs, grovfoder

© 2025 Dan-Axel Danielsson, Michael Murphy, Junko Takahashi Schmidt, Annie Larsson, Elisabet Nadeau

Detta verk är licensierat under CC BY NC 4.0, andra licenser eller upphovsrätt kan gälla för illustrationer.

Sammanfattning

Syftet med denna studie var att undersöka vilka ligninkomponenter som påverkar fibersmältbarheten hos gräs. Fibersmältbarhet analyserades som neutral detergent fiber digestibility med near infrared spektroskopi på förstaskörd av gräs av arterna ängssvingel (*Festuca pratensis*), rörsvingel (*Festuca arundinacea*), engelskt rajgräs (*Lolium perenne* L.), hundäxing (*Dactylis glomerata*) och timotej (*Phleum pratense* L. Totalt skördades 14 olika sorter vid två utvecklingsstadier och under två år.

Ligninkomponenterna guaiacyl, syringyl och *p*-hydroxyfenyl analyserades med pyrolys-gaskromografi/masspektroskopi. Lignin analyserades också som acetylbromidlösligt lignin (ABSL) och med nära-infraröd spektroskopi. Hydroxykanelsyrorna kumarsyra och ferulinsyra analyserades med pyrolys gaskromografi/masspektroskopi efter att tetrametylammoniumhydroxid tillsatts.

Syringyl var den ligninkomponent som hade starkast korrelation med fibersmältbarheten. Korrelationen var negativ och starkare ju längre tid som fibersmältbarheten mättes.

Innehållet av hydroxykanelsyror var negativt korrelerat med fibersmältbarheten, när den mättes under kort tid (30 timmar). Fibersmältbarheten påverkades inte av innehållet av hydroxykanelsyror när den mättes under längre tid (120 respektive 240 timmar).

Nyckelord: fibersmältbarhet, lignin, guaiacyl, syringyl, *p*-hydroxyfenyl, hydroxykanelsyra, kumarsyra, ferulinsyra, gräs, grovfoder

Abstract

Prediction of fibre digestibility by lignin analysis

The purpose of this study was to investigate which lignin components affect the fiber digestibility of grasses. Fiber digestibility was analysed as neutral detergent fibre digestibility with near infrared spectroscopy on first cut of the grass species meadow fescue (*Festuca pratensis*), tall fescue (*Festuca arundinacea*), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), cocksfoot (*Dactylis glomerata*) and timothy (*Phleum pratense* L). In total 14 varieties were cut at two maturity stages and during two years.

The lignin components guaiacyl, syringyl, *p*-hydroxyfenyl were analysed with pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. Lignin was also analysed as acetyl bromide soluble lignin and with near infrared spectroscopy. The hydrocinnamic acids coumaric acid and ferulic acid were analysed with pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry after tetramethylammonium hydroxide was added.

Syringyl had the strongest correlation with fibre digestibility. The correlation was negative and strengthened with the time that digestibility was measured.

The amount of hydrocinnamic acids was negatively correlated with fibre digestibility, when the digestibility was measured for a short time (30 hours). Fibre digestibility was not affected by the amount of hydrocinnamic acids, when it was measured for longer times (120 or 240 hours).

Keywords: fibre digestibility, lignin, guaiacyl, syringyl, *p*-hydroxyfenyl, hydrocinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid grass, forage

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	5
Förkortningar	6
1. Bakgrund	7
2. Material och metoder	8
3. Resultat och diskussion	10
Referenser	13
Tack	15

Tabellförteckning

Tabell 1. Medel, max och minvärde och standardavvikelse för registrerade parametrar (n=56).....	10
Tabell 2. Korrelation mellan fibersmältmarhet (NDF 30h) och olika analysmetoder av lignin för båda skördeåren. Korrelationer uppe till höger och P-värden nedan till vänster (n=56).....	11
Tabell 3 Medelvärde av lignin för de olika analysmetoderna de olika åren (n=28).....	11
Tabell 4. Korrelationer mellan fibersmältbarhet, syringyl och hydroxykanelsyror Korrelationer uppe till höger och P-värden nedan till vänster (n=56).....	12

Förkortningar

ABSL	Acetyl Bromide Soluble Lignin
GC/MS	Gaskromatografi/masspektroskopi
Py	Pyrolys
NDFD 30h	Fibersmältbarhet efter 30 timmar
NDFD 120h	Fibersmältbarhet efter 120 timmar
NDFD 240h	Fibersmältbarhet efter 240 timmar
NIRS	Near infrared spektroskopi
SW	Svalöv Weibull
TMAH	Tetrametylammoniumhydroxid
VOS	Vomvätskelöslig organisk substans

1. Bakgrund

Lignin, som är en del av växtens fiberfraktion, är en strukturell polymer av fenoler som är nödvändig för tillväxt och stabilitet i växten. Ligninhalten i gräs varierar beroende på växtens utvecklingsstadium (Wallsten & Hatfield, 2016) och vilken analysmetod som används för att kvantifiera ligninet (Krizsan et al., 2014). Då ligninet i sig anses osmältbart spelar det en stor roll för grovfodrets smältbarhet, som i sin tur har stor påverkan på såväl mjölkproduktion som tillväxt hos idisslare.

De tre monomererna syringyl, guaiacyl och p-hydroxyfenyl bildar huvuddelen av ligninstrukturen som även innehåller mindre mängd av hydroxykanelsyrorna ferulinsyra och kumarsyra. De binder in både till ligninet och till de strukturella kolhydraterna i växtens cellväggar. De här lignin-kolhydratbindningarna anses påverka fibersmältbarheten i grovfoder (Adesogan *et al.*, 2019, Eraso och Hartley, 2009, Grabber et al., 2009, Hartley 1972, Kärkönen et al, 2014, Taboada, 2010). I en svensk studie (Sousa *et al.*, 2021) erhöles lägre produktionsresultat hos mjölkkor som utfodrades rörsvingel, jämfört med de som utfodrades timotej, eller ängssvingel. En trolig orsak till detta var att rörsvingelensilaget innehöll mer kumarsyra.

Lignin är i princip osmältbart och en skattning av mängden lignin i ett grovfoder ger en bra uppfattning om fodrets smältbarhet (Jung & Allen, 1995). Fukushima & Hatfield (2012) och Moreira et al. (2014) anser att ABSL (Acetyl Bromide Soluble Lignin) är en bra metod att skatta mängden lignin. Grabber (2019) anger att olika metoder ger det mest exakta värdet beroende på hur lignifierad växten är.

Det är särskilt syringyl och/eller kvoten mellan syringyl och guaiacyl som påverkar smältbarheten (Kärkönen et al, 2014, Taboada, 2010, Wang et al. 2020).

Analys av ligninets sammansättning har under en längre tid varit vanlig i trä- och skogsindustrin, men för vallväxter är sammansättningen till stor del fortfarande outforskad. Gräs- och baljväxter består, till skillnad från trä, av en stor andel proteiner och lösliga kolhydrater som försvårar isolering och analys av ligninkomplexets sammansättning.

Syftet med denna studie var att undersöka vilka ligninkomponenter som påverkar fibersmältbarheten hos gräs.

2. Material och metoder

På Lantmännens försöksstation Svalöv skördades 14 sorter av fem olika gräsarter 2019 och 2020. Det var sorterna SW Minto och Tored av ängssvingel (*Festuca pratensis*); Swaj och nummersorterna SW TF5003 och SW TF5004 av rörsvingel (*Festuca arundinacea*); SW Birger och nummersorterna SW PR1004 och SW PR1005 av engelskt rajgräs (*Lolium perenne* L.); sorten Swante av hundäxing (*Dactylis glomerata*) och sorterna Grindstad, Ragnar, Rakel, Switch och Tryggve av timotej (*Phleum pratense* L.). Två upprepningar av varje skördetidpunkt och sort skördades.

Det var årets första skörd och gräsen skördades vid två tillfällen. Det var vid begynnande axgång och 10-12 dagar senare.

Fibersmältbarhetsanalyserna (NDFD 30H, NDFD 120H och NDFD 240H) utfördes med nära-infraröd spektroskopi av Dairy One, Ithaca, New York State, USA. En upprepning gjordes på proverna från 2019, men inga upprepningar gjordes på proverna från 2020.

Analys av ligninkomponenter och hydroxykanelsyror utfördes av Umeå Plant Science Center, SLU. Proven torkades i värmeskåp (65°C i 24 timmar), maldes på kulkvarn. Lösligt protein och lösliga kolhydrater avlägsnades genom cellväggsisolering. Proven tvättades tre gånger med buffertlösning (50mM NaCl), tre gånger med 80 % etanol, tre gånger med aceton och två gånger med kloroform:metanol (2:1). Proven behandlades med cellulas i tre dygn i roterande ugn, 50 °C. Proven centrifugerades och tvättades två gånger med destillerat vatten. Därefter analyserades ABSL (Acetyl Bromide Soluble Lignin) och de enskilda ligninkomponenterna med pyrolys-gaskromatografi/masspektroskopi (Py-GC/MS) utrustad med en autosampler (PY-2020iD and AS-1020E, Frontier Lab, Japan) kopplat till en GC/MS (7890A/5975C; Agilent Technologies AB, Sweden). Provet separerades och analyserades enligt Gerber *et al.* (2012). Hydroxykanelsyrorna analyserades med ovanstående metod efter att tetrametylammoniumhydroxid tillsatts. (Py-TMAH).

Den statistiska bearbetningen av analyserade parametrars påverkan på fibersmältbarheten utfördes som stegvis regressionsanalys med PROC PHREG i SAS (ver 9.4) med följande parametrar

- Guaiacyl
- *p*-Hydroxyfenyl
- Syringyl
- Lignin (= summan av guaiacyl, *p*-hydroxyfenyl, syringyl och de generiska benzenderivatet) analyserat med Py-GC/MS
- Kumarsyra
- Ferulinsyra
- Hydroxykanelsyror (= summan av kumarsyra och ferulinsyra)
- Lignin analyserat som ABSL

Använda värden på fibersmältbarhet var NDFD 30H, NDFD 120H och NDFD 240 H.

Den statistiska bearbetningen av korrelationen mellan fibersmältbarhet och olika metoder att mäta lignin utfördes med PROC CORR i SAS (ver 9.4) med följande parametrar:

- Fibersmältbarhet uttryckt som NDFD 30H, analyserat med NIRS
- Lignin analyserat med NIRS
- Lignin analyserat som ABSL
- Lignin som summan av guaiacyl, syringyl, *p*-hydroxyfenyl och generiska benzenderivat analyserat genom pyrolys GC/MS.

Den statistiska bearbetningen av korrelationen mellan fibersmältbarhet och syringyl respektive kanelsyror PROC CORR i SAS (ver 9.4) med följande parametrar:

- Fibersmältbarhet uttryckt som NDFD 30H, NDFD120H och NDFD 240H, analyserat med NIRS
- Syringyl, pyrolys GC/MS.
- Hydroxykanelsyror analyserat med TMHA-pyrolys GC/MS

3. Resultat och diskussion

Medelvärdena för registrerade parametrar beroende på metod framgår av tabell 1. När man analyserar lignin med pyrolys-gaskromatografi/masspektroskopi (Py-GC/MS) erhåller man också ett litet värde på generiska benzenderivat som också anses vara en del av ligninet. Även de generiska benzenderivatet har tagits med när mängden lignin beräknats förutom huvudbeståndsdelarna guaiacyl, syringyl och *p*-hydroxyfenyl.

Tabell 1. Medel, max och minvärde och standardavvikelse för registrerade parametrar (n=56)

Parameter	Medelvärde	Stv	Min	Max
NIR				
NDFD 30H, % av NDF	60,7	5,9	49,2	70,6
Lignin, % av kg ts	3,8	0,8	2,1	5,1
ABSL på cellväggar				
Lignin, enheter	15,3	2,3	10,9	20,3
Py-GCMS på cellväggar				
Lignin, enheter	15,4	1,9	12,4	20,7
Guaiacyl, enheter	8,1	1,0	6,4	11,2
Syringyl, enheter	3,4	1,0	1,8	6,0
<i>p</i> -Hydroxyfenyl, enheter	3,1	0,4	2,4	4,3
Generiska benzenderivat, enheter	0,7	0,3	0,3	1,0
TMAH Py-GCMS på cellväggar				
Hydroxykanelsyror, enheter	16,5	1,8	12,9	20,4
Kumarsyra, enheter	6,9	1,1	4,4	9,5
Ferulinsyra, enheter	9,6	1,2	7,8	12,0

Den stegvisa regressionsanalysen för pyrolysvärdena visade att två parametrar hade signifikant effekt på fibersmältbarheten uttryckt som NDFD 30H. Det var summan av ligninkomponenterna (guaiacyl, syringyl, *p*-hydroxyfenyl och generiska benzenderivat) analyserat med Py-GC/MS-metoden som gick in först och summan av hydroxykanelsyrorna (*p*-kumarsyra och ferulinsyra) analyserat med TMAH Py-GCMS-metoden som gick in därefter. Lignin enligt ABSL-metoden, enskilda ligninkomponenter eller de enskilda hydroxykanelsyrorna hade ingen

signifikant effekt på fibersmältbarheten när hänsyn till summan av ligninkomponenter och hydroxykanelsyror tagits.

När en stegvis regressionsanalys kördes med fibersmältbarheten uttryckt som NDFD 120H gick enbart syringyl in i modellen. När fibersmältbarheten uttryckt som NDFD 240 timmar gick först värdet på syringyl in i modellen och därefter summan av hydroxykanelsyror. P-värdet för hydroxykanelsyror var 0,0423 och kan bero på slumpen (se även resultat i tabell 4).

Att andelen lignin påverkar smältbarheten hos foder är allmänt känt men vilken metod som ger den bästa skattningen av lignin råder det osäkerhet kring om. I tabell 2, redovisas korrelationer mellan de olika analysmetoderna och fibersmältbarheten.

Tabell 2. Korrelation mellan fibersmältbarhet (NDF 30h) och olika analysmetoder av lignin för båda skördeåren. Korrelationer uppe till höger och P-värden nedan till vänster (n=56)

	NDFD 30H	ABSL	Py GC/MS	NIR
NDFD 30H	1	-0,71	-0,71	-0,59
ABSL	<,0001	1	+0,46	+0,41
Py GC/MS	<,0001	0,0004	1	+0,54
NIR	<,0001	0,0017	<,0001	1

Lignininnehållet är negativt korrelerat med fibersmältbarheten (NDFD 30h) oavsett analysmetod, men sinsemellan är korrelationerna mellan de olika analysmetoderna medelhöga. Proverna från 2019 och 2020 analyserades inte vid samma tillfällen och det är inte självklart att analyserna är jämförbara. Om man jämför resultaten för 2019 och 2020 (tabell 3) var lignin analyserat i cellväggarna högre 2020 än 2019 om ABSL-metoden användes, medan förhållandet var det omvända om Py-GC/MS-metoden användes. Resultaten från NIR-analyserna ligger i linje med resultaten från Py-GC/MS.

Tabell 3. Medelvärde av lignin för de olika analysmetoderna de olika åren (n=28).

	2019	2020
ABSL, enheter	14,5	16,0
Py GC/MS, enheter	16,3	14,5
NIRS, % av ts	3,83	3,45

Vilken metod som bäst skattar lignininnehållet ger inte denna studie svaret på. Det viktigaste är kanske inte att skatta innehållet av lignin. Det finns ett flertal studier som visar på att den ligninkomponent som har störst betydelse för fibersmältbarheten är syringyl. I en del studier anger man kvoten mellan syringyl och guaiacyl som den parameter som betyder mest. I detta material var korrelation mellan värdena för syringyl och kvoten mellan syringyl och guaiacyl 0,94.

I tabell 4 redovisas korrelationer mellan hur mycket fiber som smälts efter olika lång tid, syringyl och hydroxykanelsyror.

Tabell 4. Korrelationer mellan fibersmältbarhet, syringyl och hydroxykanelsyror Korrelationer uppe till höger och P-värden nedan till vänster (n=56)

	NDFD 30h	NDFD 120h	NDFH 240h	Syringyl	Hydroxy- kanelsyror
NDFD 30h	1	+0,70	+0,80	-0,65	-0,36
NDFD 120h	<0,001	1	+0,91	-0,77	+0,14
NDFH 240h	<0,001	<0,001	1	-0,85	+0,07
Syringyl	<0,001	<0,001	<0,001	1	-0,24
Hydroxy- kanelsyror	0,0061	0,2971	0,5270	0,0795	1

Hydroxykanelsyrorna har endast betydelse för smältbarheten mätt efter 30 timmar. Om den mäts efter 120 eller 240 timmar är inte innehållet av hydroxykanelsyror signifikant korrelerat med smältbarheten. Syringyl är korrelerat med fibersmältbarheten och ju längre tid som smältbarhetens mäts på desto högre är korrelationen mellan syringyl och smältbarhet. För idisslare som äter en foderstat där fodret har hög passagehastighet har hydroxykanelsyrorna betydelse för smältbarheten.

Dessa resultat kan ge en förklaring till varför rörsvingel vid analys ofta erhåller höga VOS-värden, men enligt flera mjölkproducenter blir inte mjölkproduktionen den förväntade (Murphy et al. 2017). I samma studie redovisas också en lägre nedbrytningshastighet för rörsvingel jämfört med för timotej. Det finns studier som visar att rörsvingel innehåller mer hydroxykanelsyror än andra gräs (Danielsson et al 2025, Sousa et al. 2023). Utifrån resultaten i denna studie sänker hydroxykanelsyrorna smältbarheten mätt under en kortare tid. Det har effekt på mjölkproduktionen då fodrets passagehastighet hos högmjölkkande mjölkkor är hög och fodret ska smältas under en kortare tid. Vid en VOS-analys inkuberas proverna i 96 timmar. Resultaten i denna studie tyder på att halten hydroxykanelsyror inte har någon betydelse när smältbarheten mäts under en tid så lång tid som vid en VOS-analys.

Referenser

- Adesogan A.T., Arriola K.G., Jiang Y., Oyebade A., Paula E.M., Pech-Cervantes A.A., Romero J.J., Ferraretto L.F., Vyas D. 2019. Symposium review: Technologies for improving fiber utilization. *Journal of Dairy Science* 102(6), 5726–5755. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15334>.
- Danielsson, D-A., Larsson, A., Takahashi Schmidt, J., Nadeau, E. 2025. Art- och sortskillnader i fodervärde hos gräs. Rapport 7. Institutionen för tillämpad husdjursvetenskap och välfärd. SLU, Uppsala
- Eraso, F, Hartley R.D. 1990. Monomeric and Dimeric Phenolic Constituents of Plant Cell Walls -Possible Factors Influencing Wall Biodegradability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51, 163-170
- Fukushima, R., Hatfield, R. 2004. Comparison of the Acetyl Bromide Spectrophotometric Method with Other Analytical Lignin Methods for Determining Lignin Concentration in Forage Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3713-3720
- Gerber, L., Eliasson, M., Trygg, J., Moritz, T., Sundberg, B. 2012. Multivariate curve resolution provides a high-throughput data processing pipeline for pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry *Journal of analytical and applied Pyrolysis*. 95, 95-100
- Grabber, J.H. 2019. Relationships between Cell Wall Digestibility and Lignin Content as Influenced by Lignin Type and Analysis Method. *Crop Science*. 59:1122–1132 (2019). doi: 10.2135/cropsci2018.09.0563
- Grabber, J.H., Mertens, D.R., Kim, H., Funk, C., Lu, F. & Ralph, J. (2009). Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1), 122-129.
- Hartley, R.D. 1972. *p*-Coumaric and Ferulic Acid Components of Cell Walls of Ryegrass and their Relationships with Lignin and Digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23, 1347-1354
- Jung, H. G., & Allen, M. S. (1995). Characteristics of Plant Cell Walls Affecting Intake and Digestibility of Forages by Ruminants. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2774-2790.
- Krizsan, S., Mirzaei Alamouti, H., Rinne, M., Huhtanen, P. (2014). Indigestible neutral detergent fibre in predictions of grass and red clover silage digestibility. *Grass and forage science*, 69(2), 266-275.

- Kärkönen, A. Tapanila, T. Laakso, T. Seppänen, M.M., Isolahti, M., Hyrkäs, M., Virkajärvi, P. Saranpää, P. J. 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014, 62, 6091–6099 doi:10.1021/jf5016494 |
- Moreira-Vilar F. C., Siqueira-Soares Rde. C., Finger-Teixeira A., de Oliveira D. M., Ferro A. P., da Rocha G. J., Ferrarese Mde. L., dos Santos W. D., Ferrarese-Filho O. (2014). The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than klason and thioglycolic acid methods. *PloS One*, 9(10), e110000. doi: 10.1371/journal.pone.0110000.
- Murphy, M. Nyemad, C., Nadeau, E. 2017. Utvärdering av rörsvingeljämfört med timotej i utfodringsförsök. Vallkonferensen 2017. Rapport nr 22, Institutionen för växtproduktionsekologi. SLU. Uppsala, 11-14.
- Sousa, D.O., Murphy M., Hatfield R., Nadeau E. (2021) Effects of harvest date and grass species on silage cell wall components and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 104(5), 5391–5404. Doi:10.3168/jds.2020-19362
- Sousa, D. Murphy, M., Larsson, A. Hatfield, R. Takahashi, J. Nadeau, E. 2023. Effects of grass species on cell wall components and milk production of dairy cows Vallkonferensen 2023. Rapport nr 34, Institutionen för växtproduktionsekologi. SLU. Uppsala. 105-108. DOI:10.54612/a.5150sdfpvh
- Taboada, A. Novo-Uzal, E., Flores, G., Loureda, M., Ros Barcelo, A., Masa, A., Pomar, F. 2010. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2010; **90**: 1155–1162
- Wang, R., Sun, R. Zheng, F. Tang K., Liu, D. 2020. Rapid Estimating Rumen Digestibility of Forage with Lignin Structures Bases on Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Science of Advanced Materials*, Volume 12, Number 8, August 2020, 1164-1174(11) doi: 10.1166/sam.2020.3775
- Wallsten, J. & Hatfield, R. (2016). Cell wall chemical characteristics of whole-crop cereal silages harvested at three maturity stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(10), 3604-3612.

Tack

Tack till Lantmännen som bekostat denna studie.