

"EFFEKT AV BOTANISK SAMMENSETNING I BEITE PÅ
OKSIDATIV STABILITET I KUMELK"

"EFFECT OF BOTANICAL COMPOSITION IN PASTURE ON OXIDATIVE
STABILITY IN COWMILK"

ANNE HOLTER VAE

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
INSTITUTT FOR HUSDYR- OG AKVAKULTURVITENSKAP (IHA)
MASTEROPPGAVE 30 STP. 2009



Forord

Denne masteroppgaven er en del av et forsøk som ble utført ved Senter for Husdyrforsøk (SFH) ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap (UMB), sommeren 2008. Forsøket denne sommeren er igjen en del av et større CORE Organic-prosjekt der forskere fra Norge, Sverige, Danmark og Finland utfører individuelle forsøk, men under samme overskrift. Den norske delen i prosjektet som går over 3-4 år ønsker å se på hvordan ulike driftsformer og botanisk sammensetning virker inn på melke kvaliteten. Håvard Steinshamn (Bioforsk Økologisk) er prosjektansvarlig i Norge og Steffen Adler (Bioforsk Økologisk) har ansvar for forsøkene og skriver sin doktoravhandling (PhD) på grunnlag av disse. Analysene ble finansiert av CORE Organic Funding Body Network.

Jeg vil gjerne takke alle som har bidratt inn mot det som har vært min del av dette prosjektet. Steffen Adler har vært en konstruktiv diskusjonspartner i forbindelse med forsøk og tolkning av resultater, og han har gitt mye og god hjelp til statistiske beregninger. Takk til Håvard Steinshamn, som tok meg med i prosjektet og svarer rekordfort på e-post. Takk til Søren Krogh Jensen for gode råd og for analysene gjort ved Forskningscenter for økologisk landbrug Foulum ved Aarhus Universitetet. Takk til alle ansatte ved kjøttlaben på Nofima for overbærenhet i forbindelse med mine analyser og til alle medstudenter på lesesalen for gode og forfriskende samtaler og diskusjoner. Takk til professor Roger Abrahamsen som velvillig lånte ut fagbøker og kom med gode råd underveis. En spesiell takk til min tålmodige mann, Kai Egil Vae, for fantastisk støtte under hele prosessen.

Biveileder Annette Veberg Dahl ved Nofima Mat fortjener en stor takk for hjelp og støtte i forbindelse med analysene, hjelp til beregninger av data, og for generell god og konstruktiv veiledning.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til hovedveileder førsteamanuensis Erling Thuen ved Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap på UMB for god og verdifull veiledning og støtte gjennom hele prosessen.

Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap

UMB

Ås, 13.5.2009

Anne Holter Vae

Refleksjon

Denne oppgaven er mitt avsluttende arbeid her på Universitet for Miljø og Biovitenskap på Ås. Det har vært seks lærerike år på flere plan, faglig, men i tillegg er det å befinne seg i et levende studentmiljø utviklende i seg selv. Jeg har fått faglige utfordringer, hatt dyktige lærere, og blitt kjent med mange flotte og forskjellige mennesker.

Valget av masteroppgave var tidkrevende og selv om jeg begynte å tenke på det allerede i tredje klasse var det først i fjor vår at ting begynte å legge seg til rette. Etter et år som gjestestudent ved agroecology linja på Institutt for Plante og miljøvitenskap, var interessen for å skrive en oppgave innen økologisk landbruk stor, og jeg fikk tips om å kontakte Håvard Steinshamn i Bioforsk Økologisk. Steinshamn hadde flere prosjekter på gang, men det var spesielt et der de så på hvordan ulike driftsformer og fôring virket inn på melke kvalitet som fattet interesse. Jeg fikk en avtale med Håvard Steinshamn om at jeg kunne delta i prosjektet den sommeren og ta for meg delen som omhandlet oksidativ stabilitet i melkefett. Erling Thuen ved Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap (IHA) tok på seg oppgaven som veileder og jeg ble introdusert for Steffen Adler (Bioforsk Økologisk) som skriver sin avhandling på prosjektene OrgMilk og PhytoMilk der "beiteforsøket" denne sommeren er en del av PhytoMilk prosjektet.

Jeg kom inn i prosjektet om lag ved beiteslipp i slutten av mai 2008 og ble med Steffen Adler på blant annet innsamling av prøver, botanisering, måling av beitehøyde og veging av kyr fram til begynnelsen av juli. Dette var en veldig interessant tid der jeg lærte mye både om hvordan et forsøksopplegg fungerer, samt mer praktiske ting som å kunne navngi og vurdere de ulike planteartene på beitet. I denne perioden tok vi også kontakt med Annette Veberg Dahl ved Nofima Mat som stilte sin kompetanse innen kjemi og fluorescensspektroskopi til disposisjon, samt ble min biveileder. Nofima stilte med laboratorium og Bioforsk med kjemikaliene. PhytoMilk ble finansiert av CORE-Organic.

1. september startet mine forberedelser til det som var min del av prosjektet; analysen av den oksidative stabiliteten av melkefett. Jeg hadde fått melkeprøver fra alle forsøksperiodene, samt noe melk til utprøving av metodene. Det var meningen at jeg skulle bruke to metoder, fluorescensspektroskopi og peroksidtest. Peroksidtesten var kjent fra før,

men ingen av oss hadde noe erfaring med den. Fluorescensspektroskopi var en relativt ny metode som en håpet at kunne erstatte de mer tungvinte og tidkrevende kjemiske metodene der peroksidtesten fungerte som referanse. De første ukene gikk med til planlegging og utprøving av forskjellige oppskrifter, samt diskusjoner med blant annet Roger Abrahamsen, professor i meieriteknikk ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM). Ukene med analyse var utfordrende, både fordi det var en del usikkerhet om utførelsen av analysene, og fordi det for meg som var en relativt uerfaren labarbeider var mye nytt som skulle på plass. Desto større pris satte jeg på hyggelige og hjelpsomme mennesker på Nofima Mat. Planleggingen og utførelsen av analysene ble gjort selvstendig, men med Annette Veberg Dahl i nærheten som kom med gode råd og tips.

Mine melkeprøver utgjorde en liten del av spekteret med kvalitetsparametre som ble undersøkt, og i slutten av oktober besøkte jeg sammen med Steffen Adler Universitetet i Aarhus, forskningscenter Foulum, for å se hvordan analysene av α -tokoferol (vitamin E) ble gjort der. Her ble jeg et par dager og fikk både en rask innføring i analysen, samt nyttige samtaler med Søren Krogh Jensen som er prosjektleder for den danske delen av PhytoMilk prosjektet.

I desember fikk jeg noen dager på Nofima Mat der jeg under veiledning av Annette Veberg Dahl gikk gjennom resultatene fra fluorescensspektroskopi og peroksidtesten. Resten av den statistiske behandlingen av fluorescensspektroskopi dataene ble gjort av Dahl og forklart til meg. Steffen Adler hadde allerede et stort datasett og kjørte mine rådata sammen med resten av analyseresultatene fra prosjektet i SAS (statistisk behandlingsprogram). Jeg deltok på et innføringskurs i SAS for å få en bedre forståelse av hva som ble gjort. Utover vårsemesteret har jeg så arbeidet med å tolke resultatene, sette dem i relasjon til annen forskning på samme område, samt å skrive ut masteroppgaven.

Jeg har lært mye faglig av arbeidet med masteroppgaven. Men det har også vært svært positivt og berikende å få være en del av et team der vi bygger på hverandre og der alle har sin rolle mot et felles mål. Kombinasjonen av faglig modning og erfaring fra å være en del av et forskerteam opplever jeg som verdifull ballast på veien fra universitetet og over i arbeidslivet.

Sammendrag

Økologisk melk produsert på rødkløvergrasbeite (RB) eller botanisk allsidig beite (AB) ble analysert for fettsyresammensetning, vitamininnhold og oksidativ stabilitet. Hypotesen i forsøket var at melk produsert på RB har et høyere innhold av flerumettede fettsyrer og at melkefettet dermed er mer utsatt for oksidasjon enn melk produsert på AB. Det var også forventet å finne et høyere innhold av vitaminer i melk produsert på RB enn på AB som kan hemme oksidasjonsprosessen.

I et kontinuerlig produksjonsforsøk gikk to grupper à åtte kyr (Norsk Rødt Fe) i tre perioder à tre uker på henholdsvis RB (28 % rødkløver, 19 % timotei, 33 % engsvingel, 17 % andre urter) eller AB (21 % hvitkløver, 19 % engrapp, 17 % timotei, 15 % engsvingel, 3 % rødkløver, 9 % andre urter). Forsøket gikk fra juni til september i 2008 på Ås. Begge gruppene fikk tildelt 2,67 kg ts byggkraftfôr per dag tilsatt anbefalte mengder av mineraler inkludert organisk selen. Melk fra kyrne ble samlet den siste uka i hver periode og fryst ned til -20 °C til analyse.

Beitetype påvirket ikke beiteopptaket og melkeytelsen i særlig grad. RB hadde et høyere innhold av flerumettede fettsyrer enn AB, men dette hadde ingen effekt på fettsyresammensetningen i melka. Innholdet av α - tokoferol (vitamin E) var høyere i RB enn AB. Dette gav også et signifikant høyere innhold av α - tokoferol i melka fra RB enn fra AB.

To metoder ble brukt for å måle graden av oksidasjon i melka; peroksidtest og fluorescensspektroskopi. For å sette i gang oksidering ble melka belyst i henholdsvis 0 (referanse), 24 og 48 timer. Det ble ved peroksidtesten ikke funnet noen forskjeller mellom beitetypene i mengde oksidasjonsprodukter i den belyste melka. Fluorescensspektroskopi viste forskjeller mellom gruppene i området 400-500 nm. Det er noe usikkert hva dette er da det kan være fluorescens fra både bakterier og/eller oksidasjonsprodukter.

Dette forsøket viser at melk fra beite med moderate mengder rødkløver kan ha like god oksidativ stabilitet som melk produsert på botanisk allsidig beite. Dette kan forklares ut fra at forskjeller i botanisk sammensetning på RB og AB bare førte til små endringer i melkas fettsyresammensetning. Det kan tenkes at en ville fått større forskjeller i fettsyresammensetningen dersom rødkløverandelen i RB hadde vært høyere.

Abstract

Organic milk produced from red clover grass grazing (RB) or botanical diverse grazing (AB) was analyzed for fatty acid composition, vitamin content and oxidative stability. The hypothesis of the experiment was that the milk produced on RB has a higher content of polyunsaturated fatty acids and that the milk fat thus is more prone to oxidation than milk produced from AB. It was also expected to find a higher content of vitamins in the milk produced in RB than in AB which can inhibit the oxidation process.

In a continuous production experiment two groups of eight cows (Norwegian Red Cattle) in three periods of three weeks each on RB (28% red clover, 19% Timothy, 33% meadow fescue, 17% other herbs) or AB (21% white clover, 19% Kentucky bluegrass, 17% Timothy, 15% meadow fescue, 3% red clover, 9% other herbs). The experiment ran from June to September in 2008 in Ås, Norway. Both groups were given 2.67 kg dry matter concentrate of barley per day added the recommended amounts of minerals including organic selenium. Milk from the cows was collected the last week of each period and frozen down to -20 ° C until analysis.

DM intake and milk yield was not affected by pasture. RB had a higher content of multiunsaturated fatty acids than AB but this had no effect on the fatty acid composition of the milk. The content of α -tokoferol (vitamin E) was higher in RB than AB. The content of α -tokoferol in milk was significantly higher in RB than in AB.

Two methods were used to measure the degree of oxidation in milk; peroxide test and fluorescence spectroscopy. To initiate oxidation, the milk was exposed to light in 0 (baseline), 24 and 48 hours. The peroxide method did not show any differences between the two types of pasture with regards to the amount of oxidation products in milk. Fluorescence spectroscopy showed differences between groups in the range 400-500 nm. It is somewhat unclear what this is, as it can be fluorescence from both bacteria and / or oxidation products.

This experiment shows that milk from grazing with moderate amounts of red clover can have just as good oxidative stability, as the milk produced on botanical diverse pasture. This can be explained by the differences in botanical composition of the RB and AB which only led to small changes in the milk fatty acid composition. It is conceivable that it might had been greater differences in fatty acid composition if the red clover concentration in RB had been higher.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Refleksjon	II
Sammendrag	IV
Abstract	V
1.0 Innledning.....	1
2.0 Litteraturløst.....	3
2.1 Lipider i f6r	3
2.2 Omsetning av lipider i ford6yelseskanalen.....	5
2.2.1 Lipolyse.....	5
2.2.2 Biohydrogenering	5
2.2.3 Syntese av mikrobefett.....	7
2.3 Intermediær omsetning av lipider	7
2.4 Melkefett hos dr6vtyggere	9
2.4.1 Syntese av melkefett i juret.....	10
2.4.2 Fettsyrer i melka	11
2.4.3 Faktorer som p6virker innholdet av fett i melka.....	11
2.5 Smaksfeil i melk.....	14
2.5.1 Lipolyse og besk smak	15
2.5.2 Oksidasjon og oksidasjonssmak.....	16
2.5.3 Solsmak	17
2.6 Lipidoksidasjon	17
2.6.1 Autooksidasjon	17
2.6.2 Fotooksidasjon	18
2.7 Antioksidanter	21
2.7.1 α -tokoferol (vitamin E)	21
2.7.2 Riboflavin (vitamin B ₂)	22
2.7.3 Selen.....	22
2.8 Metoder for å m6le oksidasjon i melk	23
2.8.1 Peroksidtest.....	23
2.8.2 Fluorescensspektroskopi	24
2.9 Hvordan hindre oksidasjon?	25

2.10 Effekt av botanisk sammensetning på melkefett.....	25
3.0 Egne undersøkelser	27
3.1 Hypotese	27
3.2 Materiale og metode.....	27
3.2.1 Forsøksopplegg og føring.....	27
3.2.2 Registreringer og prøvetakninger	29
3.2.3 Målinger av oksidativ stabilitet	34
Statistiske metoder	39
3.3 Resultater	40
3.3.1 Avling.....	40
3.3.2 Botanisk sammensetning i de to beitetypene.	41
3.3.3 Kjemisk analyse av fôret	42
3.3.4 Beiteopptak	43
3.3.5 Botanisk sammensetning av beiteopptaket.	44
3.3.6 Fettsyrer i fôret.....	45
3.3.7 Kjemisk sammensetning i melka.....	46
3.3.8 Fettsyrer i melk.....	47
3.4 Oksidativ stabilitet.....	48
3.4.1 Peroksider.....	48
3.4.2 Fluorescensspektroskopi	48
4.0 Diskusjon	56
5.0 Konklusjon	63
6.0 Referanser	64

1.0 Innledning

Sommeren og høsten 2008 var jeg med på et forsøk med melke kvalitet i fokus. Jeg ønsket å se på hvordan den botaniske sammensetning av beite ville påvirke den oksidative stabiliteten på melkefettet. Min problemstilling er "Effekt av botanisk sammensetning i beite på oksidativ stabilitet i melk".

Kumelk er en matvare som er dypt forankret i det norske kostholdet. Melk inneholder vann, proteiner, fett, laktose, mineraler og vitaminer, der fett utgjør mellom 3,3-4,7 %. Fokuset på sammenhengen mellom mat og helse har de siste tiårene dreid seg om fett og dets innvirkning på vår helse. Selv om helsemyndighetene lenge har fokusert på fett generelt, har en de siste årene begynt å skille mellom "sunt fett" med høy andel umettede fettsyrer og "mindre sunt fett" med høy andel metta fettsyrer. Spesielt interessante er de essensielle fettsyrene linolsyre (C18:2n-6) og α -linolensyre (C18:3n-3) som vi ikke er i stand til å syntetisere selv.

Melkens fettsyresammensetning er i stor grad et resultat av mikrobenes biohydrogenering i vomma. Selv om fôret kua spiser generelt inneholder mye umetta fettsyrer, vil mikrobenes hydrogenere en stor andel av de umettede fettsyrene slik at de når melka i mettet form.

Fett er det næringsstoffet i melk det i størst mulig grad er mulig å forandre gjennom fôring fordi fettsyresammensetning og fettinnhold i stor grad bestemmes av hva kua spiser. For eksempel vet vi at beite inneholder mer umetta fett enn surfôr og en ser at melk fra beite inneholder mer umetta fett enn melk fra surfôr.

Det er ønskelig å øke innholdet av umettede fettsyrer i melk, men uten at dette går utover melkens holdbarhet og kvalitet. Mye umetta fettsyrer i melka gjør den mer utsatt for oksidasjon (Hedegaard, 2006), og det er derfor viktig å undersøke graden av dette for å unngå uheldige kvalitetsfeil.

I økologisk driftsform har fôret et generelt høyere innhold av kløver enn konvensjonelt fôr (Adler, 2009a) grunnet behovet for nitrogenfiksering. Kløver, og da spesielt rødkløver, inneholder mer flerumetta fettsyrer enn gras. Samtidig inneholder rødkløver enzymet

polyfenoloksidase (PPO) som hemmer biohydrogeneringen i vom. Dette danner bakgrunn for å anta at melk fra rødkløver beite vil inneholde mer umetta fett enn melk fra gras.

Mitt fokus ligger på fett og hvordan den botaniske sammensetningen av beite virker inn på fettsyresammensetningen og den oksidative stabiliteten i melka.

2.0 Litteraturredel

I litteraturredelen vil jeg gi en oversikt over forskningen på området som omhandler botanisk sammensetning i grovfôr, og dets påvirkning på melkefettet, samt gi leseren noe bakgrunnskunnskap om de forskjellige mekanismene knyttet til temaet.

2.1 Lipider i fôr

De naturlige formidlene til drøvtyggere stammer fra planteriket og inneholder relativt lite lipider, 3-10 % på tørrstoffbasis. En praktisk norsk fôring består av ulike mengder og typer grovfôr og kraftfôr. Lipidene i grovfôret stammer enten fra beite eller fra gras konservert som surfôr eller høy. I kraftfôret stammer lipidene fra korn, oljemjøl, fiskemjøl og spesielle fettkilder som rapsfrø.

Plantelipidene kjennetegnes ved et høyt innhold av umetta fett der C18-fett- syrene dominerer. Beite har generelt et høyere innhold av flerumetta fettsyrer enn surfôr da tørking av grovfor har vist å gi et lavere innhold av disse (Dewhurst & King, 1998). Spesielt ungt beitegras, raigras og kløver skiller seg ut som svært gunstige med et høyere innhold av C18:2n-6 og C18:3n-3, men felles for forsøk som er gjort er at variasjonen er stor. Lorenzo et al. (2007a) så på fettsyresammensetningen gjennom en periode på 12 uker i tre forskjellige beiter, allsidig beite, beite med et høyt innhold av belgvekster (61 %), og beite med en høy andel raigras (69 %) (tabell 1). Forsøket viste en høyere andel totale fettsyrer og C16:1c9 (palmeteinsyre) i beitet med belgvekster sammenliknet med de to andre beitenene. Surfôr av rødkløvergras skiller seg ut ved å gi et høyere nivå av C18:3n-3 i melkefettet sammenliknet med melk fra surfôr av hvitkløvergras (Steinshamn & Thuen 2008), noe som er gunstig med tanke på humanernæring. Dette kan skyldes redusert biohydrogenering av C18:3 i vomma grunnet rødkløverens innhold av enzymet PPO. Det er også funnet i in Vivo forsøk (Dewhurst, 2003b) at belgvekster, spesielt hvitkløver, gir en raskere passasjehastighet, noe som kan føre til en mindre effektiv biohydrogenering av de umettede fettsyrene i vomma.

En ser også at innholdet av flerumetta fettsyrer varierer i surfôr og funn i litteraturen viser stor spredning. Steinshamn & Thuen (2008) fant en tendens til at rødkløvergras surfôr inneholdt mer av de flerumetta fettsyrene enn hvitkløvergras surfôr, spesielt C18:3n-3. Derimot fant Dewhurst *et al.* (2003a) at surfôr av hvitkløver og raigras hadde et høyere nivå av C18:2n-6, C18:3n-3 og total mengde fettsyrer enn surfôr av rødkløver. Lourenco *et al.* (2007a) så på fettsyresammensetning i kjøtt på lam som hadde gått på forskjellige beiter. Her fant de at allsidig beite og beite med belgvekster hadde et høyere innhold av C18:2n-6, men et lavere innhold av C18:3n-3 enn beite med raigras.

Tabell 1. Fettsyresammensetning på beite. Totalt fettsyre (FS) innhold (mg/g tørrstoff) og proporsjon av FS (g/100g FAME) i grasprøver tatt over en periode på 12 uker på tre forskjellige beiter. (n=12) (Lourenco, 2007a)

	Botanisk allsidig beite	Belgvekst (61 %) beite	Engelsk raigras (69 %) beite	SED	p beite
TS %	25,5	17,1	18,6	0,014	***
Total FS	18,5	29,8	25,5	1,23	***
C12:0	0,622	0,404	0,599	0,044	**
C14:0	1,82	2,06	2,04	0,147	NS
C16:0	14,5	15,1	14,4	0,403	NS
C16:1c9	1,73	2,14	1,79	0,081	**
C18:0	3,00	3,50	2,78	0,418	NS
C18:1c9	3,83	2,61	2,88	0,248	**
C18:2 n-6	18,2	17,3	13,9	0,778	**
C18:3 n-3	51,7	52,1	57,2	1,67	*
Total C18	76,8	76,7	75,5	0,638	NS

SED = Standard Error of Difference, TS = Tørrstoff

FAME = fatty acid methyl ester

* = 0,05 < P < 0,01, ** = 0,01 < P < 0,001, *** = P < 0,001, NS = ikke signifikant

Mettede fettsyrer

Melkefettet består for det meste av rette mettede fettsyrer som inneholder 4 til 18 karbonatomer. De mettede fettsyrene i melk er særegne av flere grunner. Den lave molekylvekten er betydningsfull med hensyn til melkeprodukter, den laveste syren, smørsyre (C4:0), er unik for melkefett. Selv om melkefett har et relativt lavt jodtall, er det mykt og har et lavt

smeltepunkt nettopp på grunn av disse forbindelsene med lav molekylvekt. Under normale omstendigheter er de mettede fettsyrene svært stabile (Jennes & Patton 1959).

Umettede fettsyrer

De umettede fettsyrene spiller en sentral rolle i de fysiske og kjemiske egenskapene av melkefettet, først og fremst for sin rolle i oksidativ nedbryting. Begrepet umettede fettsyrer betyr at de har en eller flere dobbeltbindinger mellom karbonatomene (C=C), enumettede fettsyrer har kun en dobbelt binding, mens flerumettede har flere. Den relativt lave forekomsten av umetta fett i melk skyldes biohydrogenering i vomma.

2.2 Omsetning av lipider i fordøyelseskanalen.

Fôrfettet forekommer i hovedsak som triglyserider i kraftfôr og galaktolipider i grovfôr. Det skjer hovedsakelig tre prosesser under fordøyelsen av fôrfett hos drøvtyggere; lipolyse, biohydrogenering og syntese av mikrobefett. Disse prosessene bidrar til en vesentlig omdanning av fôrfettet til det karakteristiske fett vi finner i produkter fra drøvtyggere.

2.2.1 Lipolyse

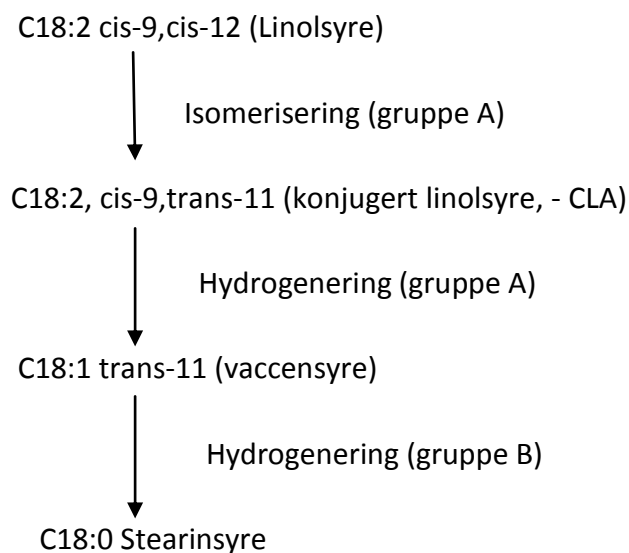
Omtrent 85 % av total FS i vomma blir utsatt for lipolyse. Under lipolysen (hydrolysen) frigjøres fettsyrene fra glyserol ved hjelp av mikrobielle lipaser (Harfoot & Hazlewood, 1988). Både bakterier og protozoer utskiller lipaser, men det antas at bakteriene har en større lipolytisk aktivitet enn protozoene (Harfoot & Hazlewood, 1988). Lipaser og fosfolipaser fra fôret bidrar også til hydrolyseaktiviteten i vomma. De frie fettsyrene som dannes under lipolysen blir enten absorbert på overflaten av mikrobene, innkorporert i mikrobepipidene, eller bundet til kationer (i første rekke kalsium) slik at det dannes kalsiumsåper. Glyserol som er igjen etter at fettsyrene er frigjort, samt galaktose fra galaktolipidene, fermenteres raskt til flyktige fettsyrer, i hovedsak propionsyre.

2.2.2 Biohydrogenering

Selv om kua får i seg mye umettet fett gjennom fôret inneholder drøvtyggerprodukter som kjøtt og melk lite av disse. Dette skyldes at det i vomma skjer en effektiv mikrobiell biohydrogenering der de umettede fettsyrene mettes med hydrogen molekyler. 70-100 % av de umetta fettsyrene blir utsatt for biohydrogenering av bakterier i vomma der

endeproduktet i hovedsak er palmitinsyre (C16:0) og stearinsyre (C18:0) (Harfoot & Hazlewood, 1988).

Det finnes mange ulike bakterier som deltar i biohydrogeneringen. Kemp og Lander (1984) delte bakteriene inn i to grupper; gruppe A og gruppe B, der en komplett hydrogenering av C18:3n-3 og C18:2n-6 til C18:0 kun kan skje dersom en har både bakterier fra gruppe A og gruppe B til stede (Harfoot & Hazlewood, 1988). Biohydrogenering av linolsyre er vist i figur 1. Linolsyre C18:2c9c12 isomerer til CLA (konjugert linolsyre, C18:2c9t11), som deretter hydrogeneres til vaccensyre (C18:1,t11) for så å bli hydrogenert til C18:0.



Figur 1. Biohydrogenering, hovedvei, av linolsyre, gruppe A og gruppe B refereres i teksten. (Harfoot & Hazlewood, 1988).

Det er flere faktorer som påvirker biohydrogeneringen i vomma, blant annet mengde og type fett, passasjehastighet og innhold av stoffer som hemmer biohydrogeneringen. Lourenco *et al.* (2007b) fant at lam som fikk rødkløvergras surfôr hadde et høyere nivå av C18:3 n-3 i vomma sammenliknet med lam som fikk hvitkløvergras surfôr noe forfatteren tror skyldes aktiviteten til enzymet PPO. Et høyere innhold av C18:3n-3 ble også funnet i melk fra surfôr av både rødkløver og hvitkløver sammenliknet med melk fra surfôr av raigras og luserne (Dewhurst *et al.*, 2003a). Kløver har også vist å gi et høyere fôropptak, noe som vil

gi en raskere passasjehastighet (hvitkløver) og kortere oppholdstid i vomma slik at mikrobenes får begrenset tid til biohydrogeneringen.

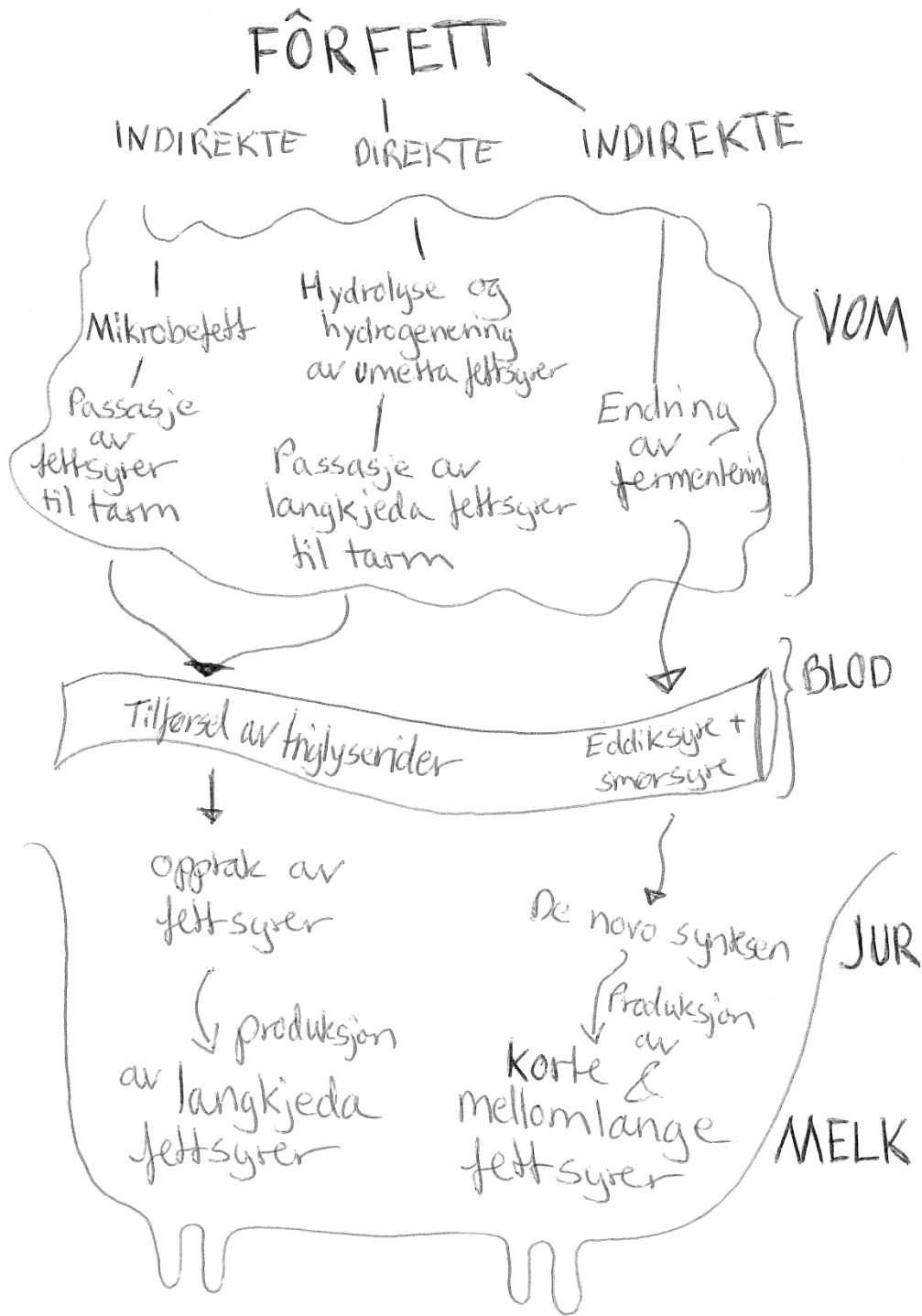
Også pH virker indirekte inn på biohydrogeneringen da de lipolytiske bakteriene er følsomme for lav pH. Ved fôring med mye kraftfôr eller stivelse slik at pH i vomma synker vil en redusere antallet lipolytiske bakterier og dermed også kapasiteten for hydrogenering. Fôr med mye struktur gir et bedre miljø for de lipolytiske bakteriene og derfor en mer effektiv hydrogenering av umetta fettsyrer (Børsting *et al.*, 2003).

2.2.3 Syntese av mikrobefett

Fra vomma passerer lipidfraksjonen uendret gjennom bladmagen (omasum). I løyen (abomasum) oppløses intakte bakterier og protozoer grunnet lav pH, slik at lipidene som ankommer tynntarmen i hovedsak (70-80 %) består av hydrolyserte, mettede fettsyrer bundet til partikkelfasen. Den resterende delen består av en varierende andel fosfolipider og andre sammensatte lipider fra vommikrobenes, samt små mengder lipider som har unngått omsetning i vomma. Bakterier og protozoer tar opp langkjedede, mettede, og enumetta fettsyrer. Disse omdannes i juret til forgreinede fettsyrer og oddetallsfettsyrer (i hovedsak C4:0- halvparten av C16:0), som er så karakteristisk for melkefettet. Fettsyrene kommer til tynntarmen der det skjer fordøyelse og absorpsjon.

2.3 Intermediær omsetning av lipider

Den intermediære omsetningen av lipider hos kua er dynamisk på den måten at det til enhver tid foregår både nedbrytning og syntese av lipider i forskjellige organer; fettvev, muskler, lever og jurvev (figur 2.) Hvilken prosess som dominerer er avhengig av tilbud og etterspørsel. Tilbudet er avhengig av mengde fôr, rasjonssammensetning og energireservene i kroppen, mens etterspørselen er avhengig av livssituasjonen til kua. Dersom kua for eksempel er i høglaktasjon og i energiunderskudd vil det mobiliseres fett fra kroppslagrene slik at det blir nok energi og substrat for dannelse av melkefett. Er derimot tilbudet større enn etterspørselen, som ved feiting, lagres overskuddet som triglyserider i fettvevet (Harstad, 1994).



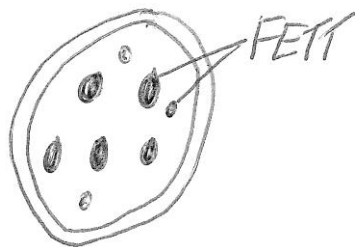
Figur 2. Indirekte og direkte virkninger av förfett på innholdet av fett i melka. -(Etter Harstad, 1994).

2.4 Melkefett hos drøvtyggere

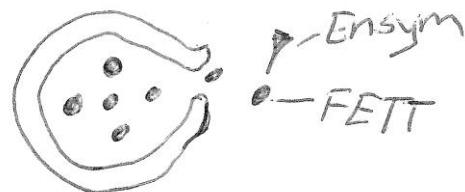
Kumelk inneholder vanligvis mellom 3,3 – 4,7 % fett, der triglyseridene dominerer (97-99 %) (Harstad, 1994). Av de mettede fettsyrene i melk er det C16:0 som dominerer og blant de umettede, oljesyre (C18:1c9), men små innslag av C18:2 n-6 og 18:3 n-3 forekommer. Det høye innholdet av oljesyre kommer av at kjertelvevet i juret har betydelig aktivitet av desaturerende enzymer (delta-9-desaturase) som plasserer en dobbeltbinding ved C-atom 9 fra karboksylgruppen. Dette gjør at blant annet C18:0 omdannes til C 18:1c9, og C18:1 t11 omdannes til CLA (C18:2, c9,t11). I melkefettet finner vi i tillegg små mengder av oddetallsfettsyrene C15 og C17. Disse er syntetisert av mikrobene i tarmen og transportert med blodet til juret og er karakteristiske for drøvtyggerfett.

Melkefettet består av små adskilte fettkuler (figur 3), mellom 2 og 5 μ i diameter (Walstra & Jenness, 1984), hvor en kjerne av triglyserider er omsluttet av en membran-kompleks sammensatt av fosfolipider og protein kalt melkefettkulemembranen (MFKM). I tillegg til å stabilisere melkefettets emulsjon og ta vare på globulinene, er fosfolipid-protein komplekset viktig for en mengde prosesser og knyttet til problemer i melk og melkeprodukter (Jennes & Patton 1959). Ved mekanisk bearbeiding eller høy temperatur kan deler av MFKM bli ødelagt.

HEL FETTKULE



MEMBRAN ØDELAGT



Figur 3. Melkefettkule (etter Harstad, 1994).

Melkefett har smeltepunkt ved 30-41 °C der nedre del domineres av umettede fettsyrer (Jennes & Patton 1959). Smeltepunktet er viktig fordi det bestemmer "flyteeenskapene" til fettsyrene. Som viktige komponenter i cellemembraner er det avgjørende at fettene innehar disse egenskapene. Smeltepunktet øker med økt kjedelengde og synker med økt antall dobbeltbindinger (Harstad, 1994).

2.4.1 Syntese av melkefett i juret

Substratene i syntese av melkefettsyrer i juret er i hovedsak eddiksyre og β -hydroksysmørsyre fra vomgjæringa, samt triglyserid fra fôret. En regner med at hos melkeku er 35-45 % av melkefettets fettsyrer syntetisert med utgangspunkt i eddiksyre. Mesteparten av β -hydroksysmørsyre inngår i de novo syntesen av kortkjedede fettsyrer (C4:0-enheter). Triglyseridene som transporteres med blodet til juret stammer dels fra tarmen (chylomikroner), og dels fra mobilisert fettvev i form av very low density lipoprotein (VLDL). Fettsyrene absorberes i juret, og i melkekjertelens kappilær-endotel finner vi en lipoproteinlipase som spalter triglyseridene. Langkjedede fettsyrer utgjør 50-70 % av fettsyrene i melkefettet. Ved betydelig underskudd på energi og nettomobilisering av fett kan disse oksideres. Glukose oksideres via pentosefosfatsyklus (20-30 %) og glykolysen (10 %), der NADPH fra pentosesyklusen er et viktig bidrag i de novo syntesen av fett i melkekjertelen under sekresjonsfasen (Harstad, 1994). En liten del av glukosen som ikke oksideres inngår i glyserolsyntese for dannelsen av triglyserider.

Karakteristisk for drøvtyggerfett er det høye innholdet av korte fettsyrer (C4:0-C10:0), som utgjør ca 10 % av fettsyrene og blir syntetisert i juret.

2.4.2 Fettsyrer i melka

Fettsyrerene i melk påvirkes blant annet av den botaniske sammensetningen i fôret. Forsøk i England (tabell 2) viser en klar tendens til at kløver gir et høyere innhold av flerumetta fettsyrer sammenliknet med gras (Dewhurst et al. 2003a, Dewhurst et al. 2003b).

Tabell 2. Fettsyresammensetning i melk (% av total mengde fettsyrer) ved fôring med surfôr av gras, gras x rødkløver, eller gras x hvitkløver. (Dewhurst et al. 2003a)

Fettsyrer	Gras basert surfôr	Surfôr av rødkløvergras (50 % rødkløver, TS basis)	Surfôr av hvitkløvergras (50 % hvitkløver, TS basis)
C6:0	2,76	2,63	2,77
C8:0	1,91	1,83	1,98
C10:0	3,32	3,26	3,54
C12:0	4,26	4,29	4,48
C14:0	12,2	12,1	12,4
C14:1	1,47	1,34	1,33
C16:0	31,5	30,0	31,0
C16:1	2,32	2,11	2,07
C18:0	10,5	10,0	10,1
C18:1	24,7	23,7	22,7
C18:2	1,42	1,69	1,45
C18:3	0,43	0,53	0,53
C18:3 / C18:2 forholdet	0,30	0,32	0,36

2.4.3 Faktorer som påvirker innholdet av fett i melka

Fett er en av de komponentene i melk det er mulig å påvirke. Både fettmengde og fettsyresammensetningen kan manipuleres noe gjennom fôring. Innholdet av fett i melk har positiv sammenheng med forsyningen av eddiksyre, β -hydroksysmørsyre og langkjedede fettsyrer (Harstad, 1994). Eddiksyre og β -hydroksysmørsyre stammer fra fermentering i vom, og er substrat for de novo syntesen av korte og mellomlange fettsyrer i juret. Langkjedede

fettsyrer stammer fra mikrobefett samt biohydrogenert fôrfett, og danner grunnlag for de langkjedede fettsyrene i melka.

Lav fettprosent i melk stammer hovedsakelig fra (Shingfield et al. 2007):

- 1) Reduksjon i produksjon av β -hydroksysmørsyre og eddiksyre i vom som medfører begrenset de novo syntese i juret. Dette ser man for eksempel når kua er i negativ energibalanse, som ved langvarig underfôring eller tidlig i laktasjon.
- 2) Økt produksjon av propionsyre og glukose slik at sekresjonen av hormonet insulin øker og gjør at fettsyrer fortrinnsvis lagres som kroppsfett, heller enn overføres til melkekjertlene. Høy kraftfôrandel (over 50 %) vil føre til lavere pH i vom og et dårligere vommiljø for de cellulolytiske bakteriene som produserer eddiksyre (Sutton, 1989). Dette fører til mindre substrat til de novo syntesen i juret, samt stimulering av insulin.
- 3) Økt propionsyre og mindre av vitamin B₁₂ i vomma gir methylmalonate som også hemmer de novo syntesen av fettsyrer i juret.
- 4) Transfett syrer som stammer fra umetta fôrfettsyrer som ikke er fullstendig biohydrogenert, kan virke direkte hemmende på fettprosenten.

Høy fettprosent oppnås ved

- 1) Kortvarig underfôring kan gi en økning i fettprosent, dette har antagelig sammenheng med nedgang i melkemengde som gir en høyere konsentrasjon av fett (Harstad, 1994).
- 2) Høyt fôrnivå gir mye substrat til mikrobene, samt at det dannes rikelige mengder eddik- og smørsyre til de novo syntesen.
- 3) I en strukturrik rasjon med stor andel grovfôr, får vi et høyt eddiksyre:propionsyre forhold. Dette gir god tilførsel til juret av substrat til de novo syntesen av fettsyrer og således mer av de korte og mellomlange fettsyrene i melka. Lite propionsyre gjør også at energien styres til juret pga. lav insulinproduksjon. Sammen gir dette en høyere fettprosent i melka. Desto lengre grovfôret er kommet i utviklingstrinn dess høyere innhold av NDF (celleveggstoff). Fôr rikt på NDF virker positivt på vommiljø slik at pH stiger og de cellulolytiske bakteriene som produserer eddiksyre trives.

4) Fôring av grovfôr før kraftfôr og/eller fôring med rotvekster vil gi en jevnere og høyere pH som gir mye av det samme resultatet som i punkt 3).

Tilførsel av noe ekstra fett i en fettfattig rasjon virker positiv på både melkeytelsen og på fettene i melka (Harstad, 1994). Likevel har et for høyt innhold av fett i fôret en rekke negative konsekvenser som nedsatt fôropptak, redusert melkeytelse og en lavere fettprosent i melka. Nedsatt fôropptak skyldes antagelig at fettene beskytter trevlene mot omsetting og/eller at fettsyrene har toksisk virkning på mikrobene i vomma (Harstad, 1994). Redusert fôropptak vil i seg selv gå ut over melkeproduksjonen.

Nedsatt innhold av fett i melka kalles gjerne fettdepresjon og skyldes i hovedsak at vomgjæringa endres slik at forholdet mellom eddiksyre og propionsyre går ned. Ved nedsatt eddiksyre:propionsyre forhold får en konkurranse mellom fettvev og jurvev, noe som fører til redusert tilgjengelighet av eddiksyre i juret. Fettvevet reagerer med økt opptak og estrifisering av langkjedede fettsyrer fra fôret og redusert mobilisering av langkjedede fettsyrer fra fettvevet til melkefettsyntesen. Dette fører tilslutt til feite kyr med lav fettprosent i melka. (Harstad, 1994)

Fôrfettet kan påvirke fettsammensetningen i melka både direkte og indirekte. Ofte har fôrfettet et høyt innslag av C16 og C18 fettsyrer som inkorporeres direkte i melkefettet (Hermansen *et al.* 2003). Økt tilgang på disse fettsyrene vil derfor bidra med å øke syntesen av triglyserider og heve fettinnholdet i melka. Slik ser vi også at fôring med for eksempel kokosfett som har et høyt innhold av C12:0 og C14:0 øker innholdet av disse mettede fettsyrene i melka (Hermansen *et al.* 2003).. Fôring med raps øker innholdet av C18:1 og C18:0 (Hermansen *et al.* 2003). Høyere innhold av fett i fôret kan innebære et lavere innhold av karbohydrater som igjen resulterer i nedsatt produksjon av eddiksyre og smørsyre i vomma. Dette kan gi negativt utslag på de novo syntesen av C4-C16 fettsyrene. Langkjedede mettede fettsyrer (C16:0 og C18:0) i fôret har liten innvirkning på fettinnholdet i melk (Harstad, 1994). Derimot har umetta fettsyrer (C18:1 (?), C18:2, C18:3) samt de mellomlange fettsyrene (C12 og C14) negativ virkning på de cellulolytiske bakteriene i vomma som resulterer i å øke forholdet propionsyre:eddiksyre. Forsøk der en ser på effekt av botanisk

sammensetning på melke kvalitet viser generelt at belgvekster gir en høyere andel flerumetta fett (Dewhurst et al. 2003a, Dewhurst et al. 2003b)

Infusjonsforsøk (Harstad, 1994) viser et utslag på hele 13-14 % for smørtsyre og langkjedede fettsyrer (Tabell 3). En må likevel trekke forsiktige konklusjoner ut fra et infusjonsforsøk da en rasjon i virkeligheten er mer komplisert.

Tabell 3. Utslag i % av å infudere eddiksyre, propionsyre, smørtsyre, glukose, aminosyrer og langkjedede fettsyrer på melkeytelsen og fett - % i melka. (Harstad 1994)

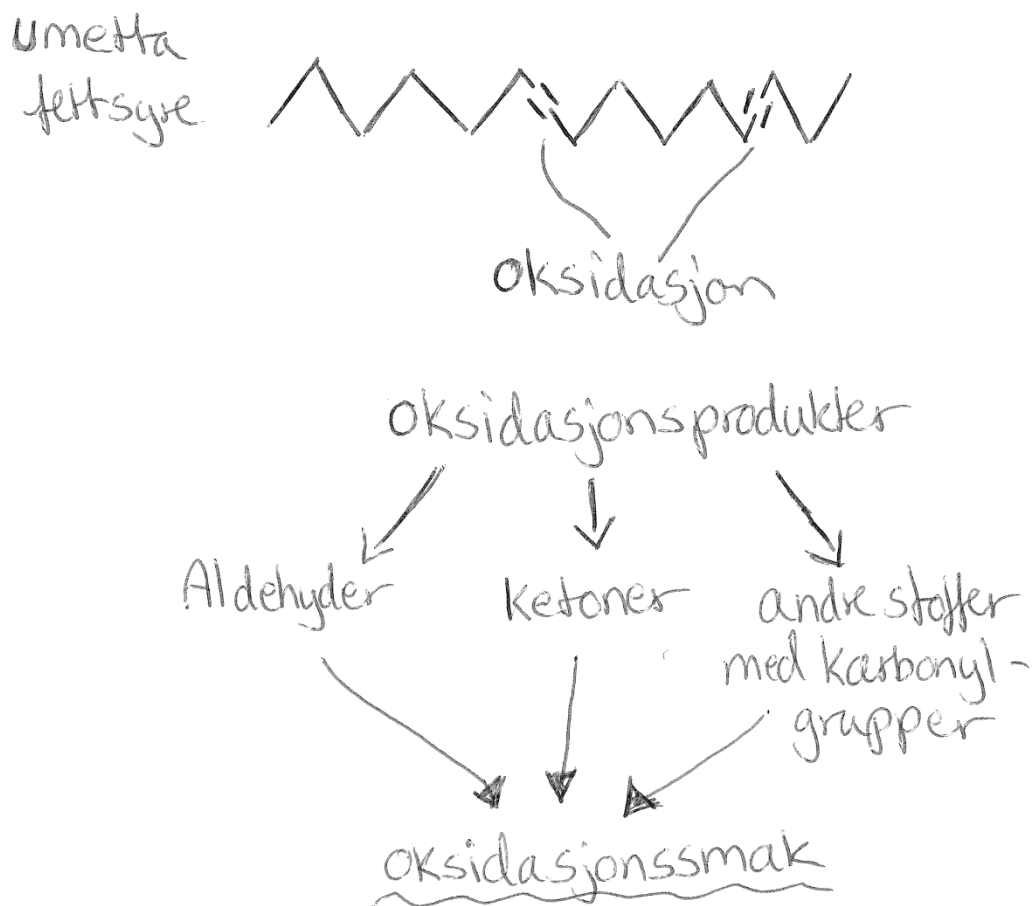
Substrat	Melkeytelse	Fett - %
Eddiksyre	+8,3	+8,9
Propionsyre	-1,6	-8,3
Smørtsyre	-4,6	+14,2
Glukose	+5,5	-10,3
Aminosyrer	+7,2	-2,5
Langkjedede fettsyrer	+2,1	+13,1

2.5 Smaksfeil i melk

Konsumentene kan selv bedømme lukt og smaksfeil og vil innrette sitt forbruk deretter. Det er derfor avgjørende å lage melkeprodukter av god kvalitet. TINE innførte i 1973 lukt- og smaksbedømmelse som obligatorisk kvalitetsprøve og som et av kriteriene for kvalitetsbetaling. Nå er smaksbedømmelsen erstattet med analyse av frie fettsyrer. Frie fettsyrer uttrykker graden av lipolyse i melka og smaksfeilene besk smak - og oksidasjonssmak har direkte sammenheng med graden av lipolyse. Smaksfeil i melk er vanlig å dele inn i; oksidasjonssmak, solsmak, besk smak, fôrsmak, sur smak og bismak, der besk smak er mest vanlig, etterfulgt av fôrsmak og oksidasjonssmak (Alfnes, 1987). Det er også disse tre siste som er mulig å påvirke gjennom fôring. Samtidig er melk og melkeprodukter generelt sensitive overfor lys. Reaksjonene som blir satt i gang av lys påvirker ikke bare den sensoriske kvaliteten, men kan også føre til dannelsen av toksiske komponenter i noen produkter og til degradering av viktige næringsstoffer (Skibsted, 2000). Melk er en viktig kilde for riboflavin (vitamin B₂), men denne brytes ned ved lyspåvirkning (Skibsted, 2000).

2.5.1 Lipolyse og besk smak

Lipolyse (figur 4) oppstår ved at lipoprotein lipase (LPL) kommer i kontakt med fettkulene og spalter fett til frie fettsyrer. Den normale funksjonen til LPL er å frigjøre fettsyrer fra lipoproteiner og chylomikroner i blodet (Walstra & Jenness, 1984) slik at disse kan tas opp og transporteres til sekresjonscellene der syntesen foregår (Harstad, 1994). LPL finnes i fersk melk, men det er først når fettkulmembranen er skadet eller ødelagt slik at LPL kan komme i kontakt med fettkulene, at lipolyse blir et problem (Walstra & Jenness, 1984). Lipase kan også komme fra andre kilder, mange bakterier både i melka og i fjøsmiljøet kan skille ut lipase, i tillegg finnes lipase i hvite blodlegemer og i jurceller (Harstad, 1994). Når melkefettet spaltes frigjøres først korte, men også lange fettsyrer, samt mono- og diglyserider (Harstad, 1994). Graden av fettspalting bestemmes ved å måle konsentrasjonen av frie fettsyrer i melka (Harstad, 1994).



Figur 4. Lipolyse av umettet fettsyre. (etter Harstad, 1994).

Lipolyse skyldes i første rekke egenskaper ved fettkulene og kan deles opp i to grupper:

-Spontan lipolyse: melk som på grunn av frie fettsyrer svært lett utvikler besk/harsk smak.

Her er det mest vanlig at det er enkelt kyr som er problem og at problemet oppstår i slutten av laktasjonen.

-Indusert lipolyse: melk som etter å ha vært utsatt for mekanisk påvirkning eller en form for temperaturmanipulasjon, utvikler besk/harsk smak.

Fôret spiller også inn på smaken ved at fôringa kan påvirke mengde og sammensetning av lipidene i blod. Dette kan skje enten direkte gjennom sammensetning av fôrfettet, via dyrets egensyntese eller via mobilisert kroppsfett (Harstad, 1994). En kan derfor tenke seg at fôringa påvirker graden av lipolyse ved enten å virke inn på egenskapene ved fettkulemembranen og/eller forekomsten av lipolyseaktiverende og lipolysehemmende komponenter i melka (Harstad, 1994).

Problemet med besk smak er minst om sommeren når dyra går på beite (Harstad, 1994), dette kan skyldes at beite har et høyere innhold av antioksidanter som kan virke forebyggende. Ellers er det viktig med god energidekning for å forebygge lipolyse. De korte fettsyrene gir direkte opphav til lipolyse noe som gjør at melkefett med høyt innhold av de novo syntetiserte fettsyrer er mer utsatt for besk smak enn melk med lavere andel av kortkjedede fettsyrer (Harstad, 1994). Små fettkuler er også dårligere rustet til å tåle fysiske påkjenninger og er derfor mer utsatt for å gi besk smak.

2.5.2 Oksidasjon og oksidasjonssmak

For å definere oksidasjon kan en si at fett som inneholder umettede fettsyrer enten kan autooksidere som er en mer eller mindre spontan og katalytisk forringelse forårsaket av kontakt med atmosfærisk oksygen (singlet oksygen, $^1\text{O}_2$) (Walstra & Jenness, 1984), eller de kan bli utsatt for kjemisk oksidasjon. Det dominerende ved oksidering av melkefett er at det har en tendens til å oppstå spontant i kontakt med luft. Denne typen oksidering er spesielt viktig med tanke på smak.

De flerumetta fettsyrene vi finner mye av i fettkulemembranens fosfolipider er utsatt for oksidering både på grunn av plasseringen mot fettkulens overflate og fordi de er umetta. Linolsyre oksiderer 64 ganger raskere enn oljesyre og linolensyre oksiderer 100 ganger

raskere enn oljesyre (Harstad, 1994). Oksidasjonsproduktene er aldehyder, ketoner og stoffer med karbonylgrupper (Harstad, 1994) og disse gir oksidasjonssmaken. Antioksidanter kan hemme oksidering (Walstra & Jenness, 1984).

Harstad (1994) skiller mellom spontan, labil og stabil melk. Spontan melk får lett oksidert smak uten noen spesielle ytre påvirkninger. Labil melk får oksidert smak ved tilsetning av jern, kopper, nikkel med mer. Stabil melk vil ikke utvikle oksidasjonssmak fordi antioksidantene har overtaket.

Det er flere faktorer ved fôring som virker inn på oksidasjonssmak. Høy ytelse og høy kraftfôrprosent øker mengden umetta fett som igjen øker sjansen for oksidasjonssmak. Dette gjelder også dersom forholdet mellom kraftfôr og grovfôr øker fordi en slik rasjon gir en større andel umetta fettsyrer som oljesyre og linolsyre. Underfôring med energi bidrar til mobilisering av kroppsfett som igjen øker andelen umetta fett i melka og dermed faren for oksidasjonssmak. Fôring med mye fett kan føre til at det blir en mindre effektiv biohydrogenering i vomma, mer umetta fett i melka som dermed er mer utsatt for oksidasjonssmak. Det er mye umetta fett i kløver som sammen med indikasjoner på at α - tokoferol (vitamin E) ikke utnyttes på samme måte som fra andre engvekster, kan tyde på at melk fra kløverbeitende kyr er mer utsatt for oksidasjonssmak.

2.5.3 Solsmak

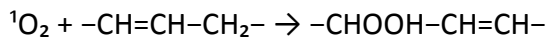
Definisjonen av solsmak stammer antagelig fra den tiden en fikk melk i melkeflasker av glass, og skyldes fotooksidasjon (Skibsted, 2000)

2.6 Lipidoksidasjon

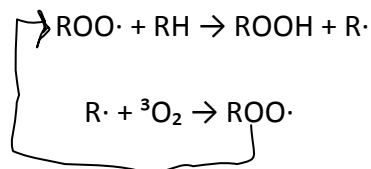
Lipidoksidasjon kan deles inn i tre typer; autooksidasjon, fotooksidasjon og enzymatisk oksidasjon. Autooksidasjon og fotooksidasjon beskrives kort her da det er disse som opptrer i forsøket.

2.6.1 Autooksidasjon

Umettede fettsyrer, frie og estrifiserte, kan oksideres. Oksygen molekyler i "singlet state" (1O_2) kan oksidere en CH-gruppe og forme et hydrogenperoksid (Walstra & Jenness, 1984):



Normalt trippel oksygen ($^3\text{O}_2$) kan ikke gjøre det, men ved noen anledninger kan $^3\text{O}_2$ forandres til $^1\text{O}_2$ ved lyspåvirkning, samt noen andre reaksjoner. Et tungmetall kan fungere som en katalysator og omdanne hydrogenperoksidet (ROOH) til et fritt radikal som kan starte en kjedereaksjon som involverer $^3\text{O}_2$ (Walstra & Jenness, 1984):



Disse reaksjonene danner hydrogenperoksider (primære oksidasjonsprodukter), og kan fortsette av seg selv, derav navnet autooksidasjon. Antioksidantene kan forstyrre reaksjonene ved å reagere med radikalene noe som sperrer for kjedereaksjonen. Dessverre brukes antioksidantene opp etter en stund slik at de fungerer som en brems, men kan ikke stoppe oksidasjonen. Dess flere dobbeltbindinger en umettet fettsyre har, dess raskere vil den autooksidere. Konjugerte fettsyrer reagerer også raskere enn ikke-konjugerte (Walstra & Jenness, 1984).

Hydrogenperoksidene brytes videre ned til en blanding av sekundære oksidasjonsprodukter; alkaner, aldehyder, ketoner, alkoholer, estere og syrer. Det er også disse som gir den karakteristiske smaken og lukten av harsk melk. De sekundære oksidasjonsproduktene kan oksideres videre til et vidt spekter av forbindelser. Interaksjon mellom sekundære oksidasjonsprodukter og proteiner, fosfolipider og nukleinsyrer, kan gi fluorescerende tertiære oksidasjonsprodukter som kan detekteres ved bruk av fluorescens spektroskopi. (Veberg et al. 2006).

2.6.2 Fotooksidasjon

Oksidasjon av lipider forårsaket av ultrafiolett eller synlig lys kalles fotooksidasjon. Fotooksidasjon kan skje ved direkte fotooksidasjon eller med en lys-sensitiv forbindelse (fotosensitiser) (Frankel, 1998). Fotosensitisere i mat inkluderer blant annet klorofyll, porfyriner og riboflavin. Direkte fotooksidasjon kommer av frie radikaler produsert av

ultrafiolett lys (UV lys) og skjer ved en vanlig kjedereaksjon av frie radikaler. Fotooksidasjon gjennom en fotosensitizer kan deles inn i Type I og Type II reaksjoner (Frankel, 1998). Disse reaksjonene konkurrerer, men ved lave oksygenkonsentrasjoner dominerer Type I reaksjonen (He et al. 1998). Type I reaksjon er en mekanisme med frie radikaler.

Eks.

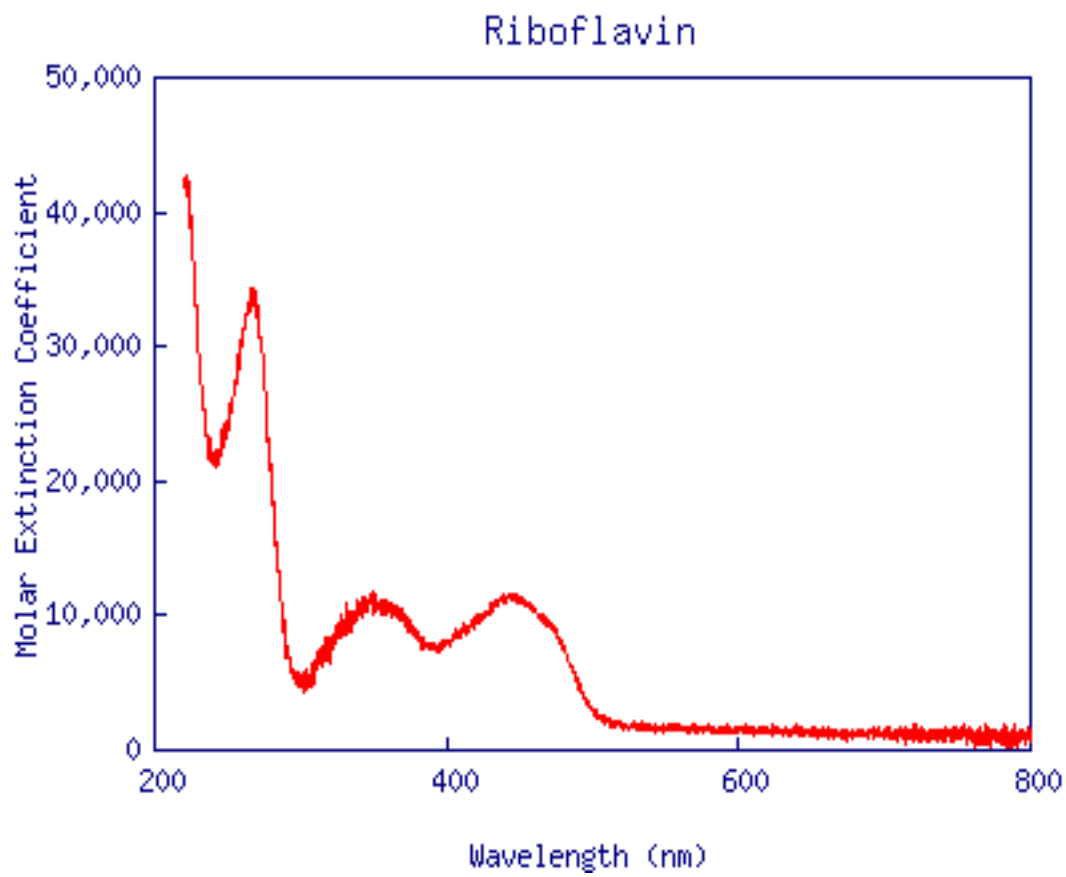
Riboflavin ($^3\text{sens}$) + LH \rightarrow (mellomstadiet?) + O₂ \rightarrow hydrogenperoksid + sens

(Frankel, 1998).

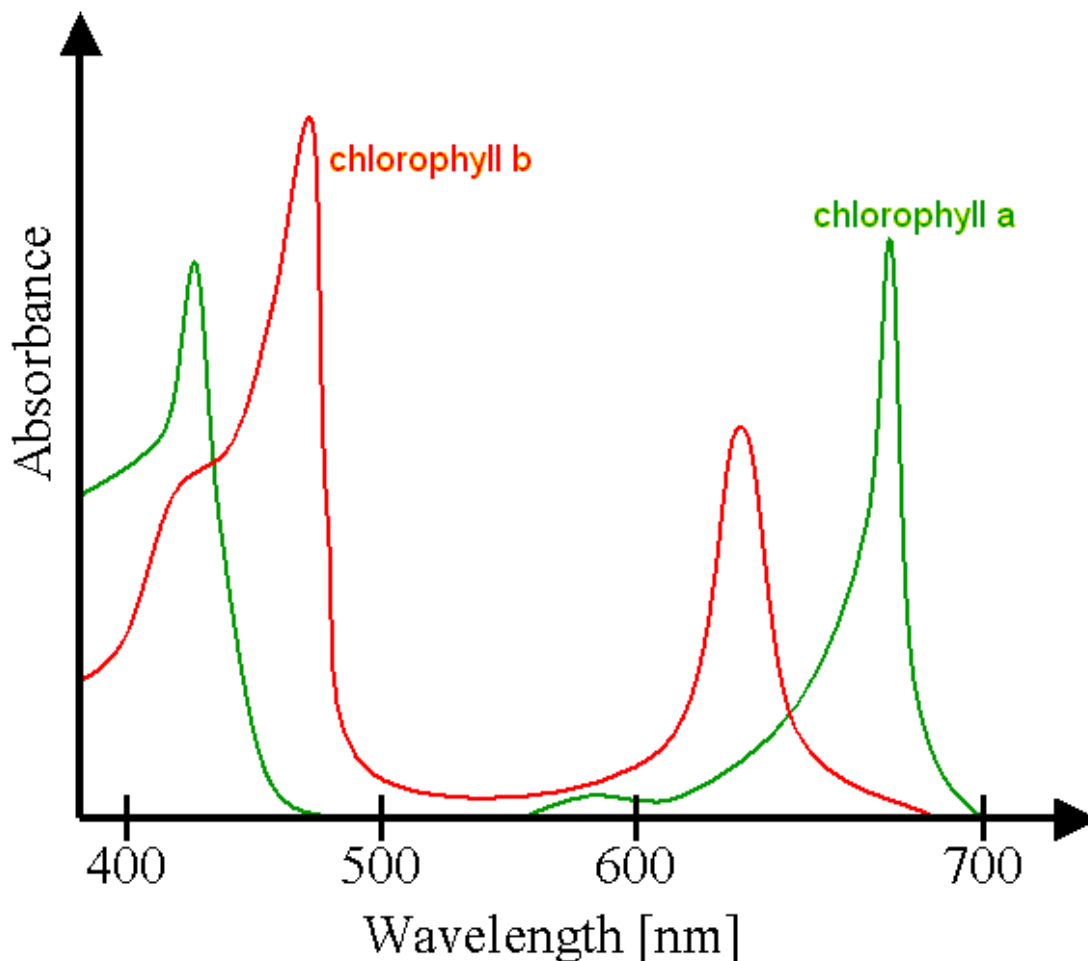
Riboflavin absorberer synlig lys ved bølgelengde rundt 450 nm (figur 5). Når dette skjer, blir molekylet løftet opp til en triplet tilstand. Deretter kan riboflavin oksidere med ulike forbindelser slik at det selv blir redusert (Walstra & Jenness, 1984). I eksempelet over reagerer triplet riboflavin med en umettet fettsyre (LH) i en Type I reaksjon og produserer de samme isomeriske hydrogenperoksidene som i en autoksidasjon med frie radikaler (Frankel, 1998).

I Type II reaksjoner reagerer den lys-sensitive forbindelsen med oksygen i grunntilstand og danner singlet oksygen ($^1\text{O}_2$), som igjen reagerer med umettede fettsyrer. Antioksidanter vil ikke hemme denne typen lys-sensitive reaksjoner, (Frankel, 1998).

Lenge har man trodd at riboflavin var den eneste fotosensitizeren i meieriprodukter (Wold *et al.* 2006). Nye studier viser imidlertid at dette ikke er tilfellet, og antagelig er de lys-sensitive forbindelsene protoporfyrin, hematoporfyrin og klorofyllderivater minst like aktive som riboflavin (Wold *et al.* 2006). Riboflavin absorberer UV lys, samt blått og fiolett lys. Protoporfyrin absorberer mest lys ved 410 nm, men også noe i resten av det synlige spekteret (Andersen *et al.* 2008). Klorofyll a og b absorberer lys som vist i figur 6, det er noe usikkert hvilket klorofyllderivat en måler i meieriprodukter, men det antas at det er noe som likner disse. Ved fotooksidasjon blir disse fotosensitiserne brutt ned. Ved bruk av fluorescensspektroskopi kan man måle nedbrytningen av disse forbindelsene og dette er dermed en indirekte måte å måle grad av fotooksidasjon.



Figur 5. Absorbsjonsspekteret til riboflavin. (2)



Figur 6. Absorbsjonsspekteret til klorofyll. (1) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll>)

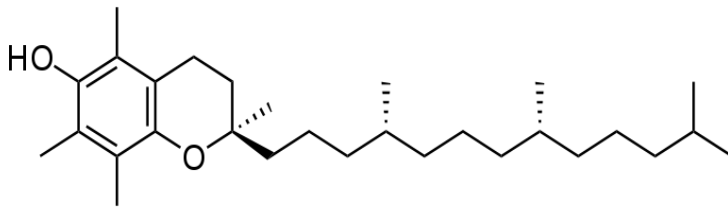
2.7 Antioksidanter

Reaktive oksygenforbindelser kan uskadeliggjøres av ulike biokjemiske reaksjoner og mekanismer som til sammen utgjør antioksidantforsvaret. Det totale antioksidantforsvaret består av ulike komponenter blant annet vitaminer, mineraler, sporstoffer og pigmenter.

2.7.1 α -tokoferol (vitamin E)

Vitamin E (figur 7) er en samlebetegnelse på tokoferoler som er fett-løslige vitaminer og antioksidanter. α - tokoferol spiller en viktig rolle som antioksidant blant annet ved å motvirke angrep fra peroksidene på cellemembranen hos umettede fettsyrer (McDonald *et al.* 2002) ved at den reagerer med lipid radikalene produsert i kjedereaksjonen med oksidativ degenerering av lipider. Lipider i melk inneholder naturlige α -tokoferoler (Walstra & Jenness, 1984) og forskning kan tyde på at det er mer α -tokoferol i melk produsert på kløver basert fôr, enn gras

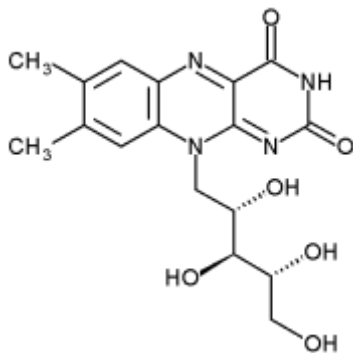
basert fôr (Dewhurst, 2003a). Den oksidative stabiliteten til melk korrelerer godt med nivået av α - tokoferol, spesielt gjelder dette for lipidene i fettkulemembranen (Frankel, 1998)



Figur 7. Kjemisk struktur av α -tokoferol

2.7.2 Riboflavin (vitamin B₂)

Riboflavin (vitamin B₂) (figur 8) er et vannløselig vitamin og en viktig antioksidant. Riboflavinet er sentralt for cellenes energiproduksjon og er viktig for karbohydrat, fett- og proteinforbrenningen. Vitaminet deltar også ved produksjon av flerumettede fettsyrer og flere viktige hormoner. Riboflavin brukes her som en indikator på oksidasjon av melkefett fordi den fluoriserer sterkt og kan ses ved fluorescensspektroskopi.



Figur 8. Kjemisk struktur av riboflavin, vitamin B₂

2.7.3 Selen

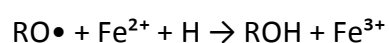
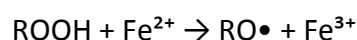
Selen er et sporstoff (grunnstoff) som inngår i enzymet glutation peroxidase som fremmer nedbrytningen av hydrogenperoxider. Sammen med α -tokoferol er den en viktig antioksidant i fôret til drøvtyggere.

2.8 Metoder for å måle oksidasjon i melk

Det finnes mange måter å måle oksidativ nedbrytning i fett. Forskjellige metoder benyttes for å måle primære, sekundære og tertiære oksidasjonsprodukter. Peroksidtest brukes for å måle primære oksidasjonsprodukter (hydroperoksider). De sekundære produktene aldehyder og ketoner kan eksempelvis måles ved TBARS metoden. Fluorescens spektroskopi måler tertiære oksidasjonsprodukter, samt nedbrytningen av fotosentisere (riboflavin, porfyriner, klorofyll etc.) Jeg vil her ta for meg de to metodene som har blitt benyttet i mitt arbeid.

2.8.1 Peroksidtest

En måte å måle oksidativ nedbrytning av melkefett er jern tiocyanat peroksidtest utviklet av Loftus *et al.* (1946). Her ser en på overgangen fra toverdige jern ioner (jern(2)) til jern, under tilstedeværelse av ammonium tiocyanat, som resulterer i et rødt pigment, jern(2)thiocyanate (Jennes & Patton, 1959). Det er peroksider i fett som oksiderer de toverdige jern ionene og som er målt ved metoden (figur9).



Figur 9. Hydroperoksider i redoks reaksjon med jern ioner.

Denne metoden er svært sensitiv (Frankel, 1998) og korrelerer godt med smaks forringelse (Jennes & Patton 1959). Peroksidene som dannes reagerer videre til sekundære oksidasjonsprodukter. Det er derfor viktig å huske på at metoden bare viser et øyeblikksbilde av peroksider i melken siden en del antagelig har reagert videre allerede (Jennes & Patton 1959). Ved autooksidasjon vil peroksid verdien nå et maksimums nivå for så å avta i varierende grad, alt etter hvilken type fett som undersøkes og status på oksidasjonen. Peroksidene når maksimumsnivå på et tidligere stadium dersom fettkilden består av mye

umettet fett. Spesielt gjelder dette flerumettede n-3 fettsyrer da deres hydrogenperoksider brytes ned lettere. Peroksidene brytes lettere ned ved tilstedeværelse av metaller, lys, eller dersom de blir utsatt for temperatur over 100 °C (Frankel, 1998).

2.8.2 Fluorescensspektroskopi

Fluorescensspektroskopi er en hurtig ikke-destruktiv måte å måle oksidasjon på. Når lys treffer en materie, kan det bli delvis eller helt absorbert. Når lys blir absorbert overføres et foton til et molekyl. Fotoner i UV og det synlige området har nok energi til å skape elektronovergang, mens fotoner med lavere energi for eksempel i det infrarøde området kun kan skape vibrasjon og rotasjons overganger. Når et molekyl bringes til et høyere nivå forblir det bare opphøyet en kort stund før det faller tilbake til grunntilstand. Det er når det faller tilbake at det gir fra seg fluorescerende lys. Dette lyset kalles luminescens. Luminescens kan videre deles inn i fluorescens og fosforescens. Fluorescens har en levetid som ligger opp mot 10 nanosekunder, mens fosforescens har levetider fra millisekunder til sekunder. Det avgitte fotonet har lengre bølgelengde (lavere energi) enn det absorberte fotonet. Denne forskyvningen kalles *Stokes shift* (Guilbault, 1989)

Fluorescens spektroskopi kan utføres på to måter, enten ved klassisk "*right-angle solution fluorescens device*" eller ved "*front face fluorescens*" (Veberg, 2006b). I klassisk fluorescens blir det som skal måles fortennet slik at absorbansen er lavere enn 0,1. "Front face fluorescens" muliggjør undersøkelser av fluorescens av pulveraktige, uklare og konsentrerte prøver, samt komplekse prøver som kjøtt, fisk og melkeprodukter (Veberg, 2006b). Ved bruk av "front face fluorescens" blir overflaten av prøven ganske enkelt belyst med det en kaller ekstasjons-lys (lys med høy energi, som oftest i UV-området) og avgitt fluorescens fra den samme overflaten blir målt. (Veberg, 2006)

Forbindelsene som fluorescerer kjennetegnes ved at de har konjugerte dobbeltbindinger. Riboflavin har flere konjugerte dobbeltbindinger og fluorescerer sterkt. Andre fluorescerende forbindelser er tryptofan, porfyriener, enzymene og koenzymene NADH, FAD og NADPH, vitaminene A, K og D, klorofyll og Schiffs baser (Veberg, 2006).

Fordelene ved front face fluorescens spektroskopi er mange. Det er en følsom teknikk og undersøkelser gjort av Veberg (2006d) viser at metoden kan avdekke oksidasjon på et tidlig

stadium. I tillegg er metoden rask, rimelig, ikke-destruktiv og målingene kan gjøres direkte på produktet uten noen form for ekstraksjon eller kjemisk behandling (Veberg, 2006a)

2.9 Hvordan hindre oksidasjon?

Lipider er viktige både som strukturelle og funksjonelle komponenter i mat. De har stor effekt på matkvaliteten, selv i matvarer der lipidinnholdet er lavt, fordi de er sårbare overfor oksidasjon. For å unngå oksidasjon er det viktig å unngå kontakt med visse metaller, spesielt kobber og jern, i tillegg til bruk av emballasje for å unngå/reducere tilgang på oksygen. Fordi melkefett er noenlunde stabilt i forhold til mange andre matvarer har det ikke vært praktisert i stor grad å tilsette antioksidanter. Dersom det tilsettes antioksidanter til melkeprodukter, kan en møte visse problemer. Avvikende smak som er direkte sporbart fra antioksidanten, er et eksempel. Siden lipidene i melk er beskyttet av en hydrofob membran er det ikke sikkert tilsetning av antioksidanter i melkeprodukter vil ha noen virkning, rett og slett fordi den ikke får komme til der det er behov (Jennes & Patton 1959).

2.10 Effekt av botanisk sammensetning på melkefett

Belgvekster, for eksempel kløver, kan leve i symbiose med nitrogenfikserende *Rhizobium* bakterier som omdanner N_2 fra lufta til nitrater (NO_3^-) og slik gjør nitrogenet tilgjengelig for planten.

Denne egenskapen/symbiosen gjør dem til en sentral vekst i økologisk sammenheng og det er nærliggende å tro at økologiske gårder har en større andel belgvekster enn konvensjonelle gårder, dette bekreftes også av undersøkelser gjort i Midt-Norge (Tabell 4) av Steffen Adler (2009).

Tabell 4. Botanisk sammensetning av eng i forskjellige driftsformer. n = 34 gårder

Botanisk sammensetning ¹	Kortvarig eng økologisk	Langvarig eng økologisk	Kortvarig eng konvensjonell	Langvarig eng konvensjonell
Andel grasarter	61 %	52 %	93 %	82 %
Andel belgvekster	31 %	14 %	3 %	1 %
Andel andre urter	8 %	34 %	4 %	17 %

¹ 1.slått, slåtteenger og kombinert slått/beite i 2007 (rangeringsmetode, 3 areal per gård), (Adler, 2009)

Botanisk sammensetning virker inn på fettsammensetningen i melka. Undersøkelser gjort i Alpene viser at kyr som har beitet på botanisk allsidig eng har en annen fettsyresammensetning enn kyr som gikk på rent gressbeite (Leiber *et al.* 2005). Blant annet hadde kyrne som beitet botanisk allsidig eng en høyere andel C18:3n-3 fettsyrer og en høyere andel oljesyrer i melkefettet (Leiber *et al.* 2005). Forsøk utført på UMB viste at melk fra kyr som ble fôret med surfôr av rødkløvergras hadde et høyere innhold av n-3 fettsyrer og flerumetta fett, enn melk fra kyr som ble fôret på surfôr av hvitkløvergras (Steinshamn & Thuen 2008).

3.0 Egne undersøkelser

3.1 Hypotese

I egne undersøkelser ønsket jeg å undersøke effekt av botanisk sammensetning på beite på fettsyre sammensetningen og oksidativ stabilitet i melk.

Dette ble konkretisert i følgende hypotese:

Melk produsert på rødkløver basert beite inneholder mer flerumetta fett og har en lavere oksidativ stabilitet enn melk produsert på botanisk allsidig beite.

3.2 Materiale og metode

3.2.1 Forsøksopplegg og fôring

Rødkløvergras beitet ble etablert i august 2007 og botanisk allsidig beite var etablert i 2001-2003. På RB ble det sådd rødkløver, timotei og engsvingel.

Beiteforsøket ble utført i perioden 12.5 – 7.9 2008. Tabell 5 gir en oversikt over forsøksopplegg og fôring.

Tabell 5. Oversikt over forsøksopplegg og prøvetaking

Uke	Periode	Dato	Mandag	Tirsdag	Onsdag	Torsdag	Fredag
17	0	21.4-27.4	Forperiode, kyrne går sammen i løsdriftsfjøs				
18	0	28.4-4.5	Prøveuttakningsuke for forperiode				
19	0	5.5-11.5	Beiteslipp				
20, 21, 22	-	12.5-1.6	Periode utgår. Men kyrne var her delt i to grupper slik som de andre periodene.				
23	Felles beite	2.6-8.6	Veie kyr, mandag – onsdag morgen				
24	1	9.6-15.6	Kalibrere høydemåler				
25	1	16.6-22.6					
26	1	23.6-29.6	Botanisk analyse		Melkeprøver K	Melkeprøver M + K	Melkeprøver M
27	Felles beite	30.6-6.7	Veie kyr	Veie kyr	Veie kyr		
28	Felles beite	7.7-13.7					
29	2	14,7-20.7	Kalibrere høydemåler				
30	2	21.7-27.7					
31	2	28.7-3.8	Botanisk analyse		Melkeprøver K	Melkeprøver M + K	Melkeprøver M
32,33	Felles beite	4.8-17.8	Veie kyr	Veie kyr	Veie kyr		
34	3	18.8-24.8	Kalibrere høydemåler				
35	3	25.8-31.8					
36	3	1.9-7.9	Botanisk analyse		Melkeprøver K	Melkeprøver M + K	Melkeprøver M
Analyser Nofima (MatForsk)							
Uke							
36	Forforsøk med utprøving av metodene						
37							
38	Analyser fluorescens spektroskopi						
39	+ hydrogenperoksid test						

Tabell 6. Viser vær situasjonen under forsøks tiden.

Tabell 6. Forsøksperioder og værobservasjoner i 2008

Forsøksperiode	Dato	Sum nedbør, med mer	Middeltemperatur, °C
Forperiode (løsdriftsfjøs)	05.05.-11.05.		
Periode 1	09.06.-29.06.	78	13,0
Periode 1	14.07.-03.08.	63	17,5
Periode 1	18.08.-07.09.	125	13,4

(Klimastasjon Ås, middeltemperatur i 2m høyde).

Forsøksdyra som ble brukt var 16 melkekyr (Norsk Rødt Fe) tilfeldig fordelt på to beitetyper, rødkløver basert beite (RB) og botanisk allsidig beite (AB). Dyra i hver beitegruppe var i gjennomsnitt 80 dager ut i laktasjon og hadde i gjennomsnitt tilnærmet lik melkeytelse. Middel vekt ved forsøksstart var $597 \pm 34,5$ kg (RB) og $598 \pm 56,3$ kg (AB), middel hold var $2,62 \pm 0,212$ (RB) og $2,89 \pm 0,48$ (AB). Forsøket ble gjennomført ved Senter for Husdyrforsøk (SHF) ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap (UMB). Kyrne hadde først en periode med lik innefôring før de ble sluppet på beite fra mai til september 2008. Innefôringsperioden ble brukt som en forperiode for å kunne korrigere forskjeller mellom dyr, (kovariat).

Beitearealene til hver gruppe var like store og ble delt i fire skift. Skiftene ble stripebeitet og tildeling av nytt areal ble daglig estimert ved hjelp av en kalibrert grashøydemåler slik at beitetilbudet ikke var begrensende for fôropptaket. Kyrne fikk nytt beite etter morgen og kveldstellet. Forsøket var delt inn i tre perioder à tre uker (Tabell 5) der den første perioden startet 9.6.2008. Mellom periodene (2 uker) gikk begge gruppene sammen på annet areal som tilsvarte allsidig beite. Kyrne fikk tildelt 3,0 kg byggkraftfôr per dag som inneholdt 92 % bygg, 5 % råørsukker og 3 % mineralblanding inkludert organisk selen. Registreringer og prøvetakninger ble gjort den siste uka i hver periode.

3.2.2 Registreringer og prøvetakninger

Botanisering:

Beitene ble botanisert etter rangeringsmetoden (Jones & Hargreaves, 1979) i begynnelsen og i slutten av hver periode. Dette ble gjort ved å gå i "WW"-form over beite, slippe en

ramme (0,5m x 0,5 m) (bilde 1) ned for hver tiende meter (totalt 50 ganger per undersøkt areal) og notere ned alle artene som fantes der. De tre planteartene det var mest av ble rangert fra 1-3.



Bilde 1. Ramme brukt til botanisering og kalibrering av beitehøydemåler.

Estimering av botanisk sammensetning

Prosentandelen av de enkelte beiteplantearter i de to beitetypene ble beregnet etter følgende formel:

Andel planteart (%) på beite x avling (kg ts/daa) = planteart (kg ts/daa)

Estimering av botanisk sammensetning av beiteopptaket

Botanisk sammensetning i beiteopptaket på flokk basis ble beregnet slik:

Beiteopptak for en planteart (kg ts/dag) = beiteopptak (NorFor plan, 2009) (kg ts/dag) x
{(avling for en planteart før avbeiting (kg ts/daa) – avling for en planteart etter avbeiting (kg ts/daa)) / avbeitet areal (daa)}

Noen verdier ble negative grunnet feilkilder, der dette skjedde er verdien satt til 0.

Resultatet er vist i %. Denne utregningen ble gjort for å korrigere for selektiv beiting.

Estimering av beiteavling og beiteopptak

Beiteopptaket ble estimert på to måter; (1) ved bruk av en kalibrert beitehøydemåler, (2) ved bruk av NorFor Plan (2009).

(1) Ved bruk av en kalibrert beitehøydemåler (MD, Stjørdal, platediameter 300 med mer, platevekt 143 g) (bilde 2), ble avlingen estimert før og etter beiting av skiftet og differansen

ble beregnet. Beitehøydemåleren ble kalibrert ved å klippe ruter (50 x 50 cm), tørke avlingen på 103 grader i 24 timer, veie og beregne en regresjonsligning som gav avlingsestimater avhengig av beitehøyde for begge beitesystemene. Gjennom hele forsøket ble det klippet 205 ruter, alle ruter inngår i regresjonsligningen. For å finne gjennomsnittsfôropptaket per ku per dag (periodevis), ble differansen i avlingen ganget med arealet, delt på antall kyr og beitedager. Dette ble gjort i prøvetakningsuka.

(2) NorFor Plan (2009) ble brukt til å beregne estimater for beiteopptak på individbasis for hver periode. På bakgrunn av kuas vekt, hold, laktasjonsnummer, laktasjonsuke, drektighetsuke, kraftfôropptak, avdrått og kjemisk sammensetning i beiten ble det foretatt en vurdering av hva beiteopptaket kan ha vært i kgTS/ku,dag.



Bilde 2. Beitehøydemåler.

Uttak av beiteprøver

I den siste uka av hver periode ble det tatt daglige prøver av beiten før avbeiting, samt prøver av kraftfôret. Beiteprøvene ble tatt ved å gå i "WW"-form over beite (før avbeiting) og klippe ned til beitehøyde (ca 5 cm over jorda). Plantene som kyrne vraket ble ikke tatt med, som for eksempel høymole og krypsleie. Fôret ble oppbevart i en pose med minst mulig luft og fryst ned til -20 °C. Like mengder av dagsprøvene for hvert beite og periode ble slått sammen og frysetørket. Beiteprøvene ble analysert for fettsyresammensetning, vitaminer og kjemisk sammensetning.

Fôrprøvene ble etter syrehydrolyse ekstrahert etter standard prosedyre, C17:0 ble tilsatt som standard (Bligh & Dyer, 1959). Fettsyresammensetning ble analysert på GC (Gas Chromatography). Innholdet av vitaminer ble målt på HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) med fluorescensdeteksjon (4,6 x 100 med mer Perkin Elmer HS-5-Silica kolonne, Fluorescensdetektor: Ex: 290 nm; Em: 327nm;) etter standard prosedyre (Bligh & Dyer, 1959). Retinol (vitamin A) ble ekstrahert med heptan-diisopropyl, α - tokoferol ble ekstrahert med hepten (Bligh & Dyer, 1959). Utført ved Aarhus Universitet, Det Jordbrugsvidenskabelige fakultet, forskningscenter Foulum. Formålet med metoden var en hurtig og sikker bestemmelse av tokoferoler og karoten uten innblanding av prøvens fettstoffer og med minst mulig oksidasjon av tokoferoler og karoten.

Innholdet av tørrstoff (TS), Kjeldahl-N, råfett, syreløselig fiber (ADF), nøytral løselig fiber (NDF), energi (NEL), aske, fordøyelighet av organisk materiale (in Vitro etter 48 t), NDF fordøyelighet (etter 48 t) og sukkerinnhold (NFC) i beite- og kraftfôrprøvene ble utført i USA (DairyOne, New York) etter standard metoder (AOAC, 2008)

Vektregistrering

Etter hver periode ble kyrne veid tre dager på rad etter morgenmelking (bilde 3).



Bilde 3. Veking av kyr.

Holdvurdering

Det ble foretatt holdvurdering ved forsøkstart og i prøvetakningsukene ved hjelp av en skala fra 1-5 med 0,25 poengs trinn, der 1 = svært mager og 5 = meget feit.

Melkeytelse og kjemisk sammensetning av melka

Melkeytelsen ble registrert morgen og kveld hver dag i prøvetakningsuka.

Melkeprøver ble tatt ut fra onsdag kveld til fredag morgen, 4 mål, og lagret ved 4 °C. Fredag etter morgenstellet ble melken fra hver ku varmet i vannbad til 37 °C, blandet, og det ble tatt ut prøver til analyse.

Melkeprøver til kjemisk analyse av fett, protein, laktose og urea ble konserverert med Bronopol og analysert av TINE distriktslab Brumundal ved hjelp av infrarød spektrometri (Milkoscan 6000 FTIR, Foss Danmark). De resterende prøver ble alle fryst i olabeger ved -20 °C inntil analyse.

Fettsyresammensetningen i melk ble bestemt med GC. Innholdet av vitaminer ble analysert ved HPLC på samme måte som fôrprøvene (Bligh & Dyer, 1959). Analysen ble utført ved Universitetet, Det Jordbrugsvidenskabelige fakultet, forskningscenter Foulum.

3.2.3 Målinger av oksidativ stabilitet

Oksidativ stabilitet ble målt ved 1) dannelse av hydrogenperoksider, og 2) grad av fotooksidasjon ved bruk av fluorescensspektroskopi (eksitasjon ved 382 nm og 410 nm).

Det ble tatt ut mellom 10 og 20 olabegere med melk fra fryseren hver dag i analyseperioden. Melken ble først tint ved romtemperatur i 3-4 timer, og deretter plassert i vannbad ved ca 37 °C til den var mest mulig homogen. Begrene ble vendt forsiktig noen ganger for å få med fettene som hadde satt seg på veggen, noe som var problematisk. Fra begrene ble melka fordelt i tre glass à ca 15 ml. Melken ble belyst i henholdsvis 0 timer (t = 0), 24 timer (t = 24) og 48 timer (t = 48). Glassene som skulle til belysning ble raskt satt i lyskassen, mens kontrollglassene (t = 0) ble satt i kjøleskap dekket med aluminiumsfolie. Kontrollprøvene ble analysert sammen med 24 t prøvene ved fluorescens, mens en trengte kontrollprøver både for 24 t og 48 t ved analyse på peroksidene. I lyskassen (Bilde 4) ble glassene satt tilfeldig inn, fordelt på ni hyller. Lysstyrken var i gjennomsnitt 1,84 lux ($\pm 0,097$). Glassene ble plassert inntil en plastterskel som holdt dem 10 cm fra lysrøret. Temperaturen i rommet hvor lyskassen sto var 5 °C, og lyset fra lysrøret (Osram L58W/830 Lumilux warmwhite, Germany) i kassen var til en hver tid eneste lyskilde. Temperaturen i lyskassen (med lys) var 5,5°. Prøvene ble tatt ut av belysning etter gitt tid og satt i kjøleskap.

Puljer på ti og ti prøver ble tatt ut av kjøleskapet, varmet opp til ca 37-39 °C og vendt opp og ned et par ganger, før det ble pipettert ut henholdsvis 2 ml melk til peroksidanalysen (som ble satt i kjøleskap i påvente av analyse) og 10 ml til fluorescens som ble analysert straks.

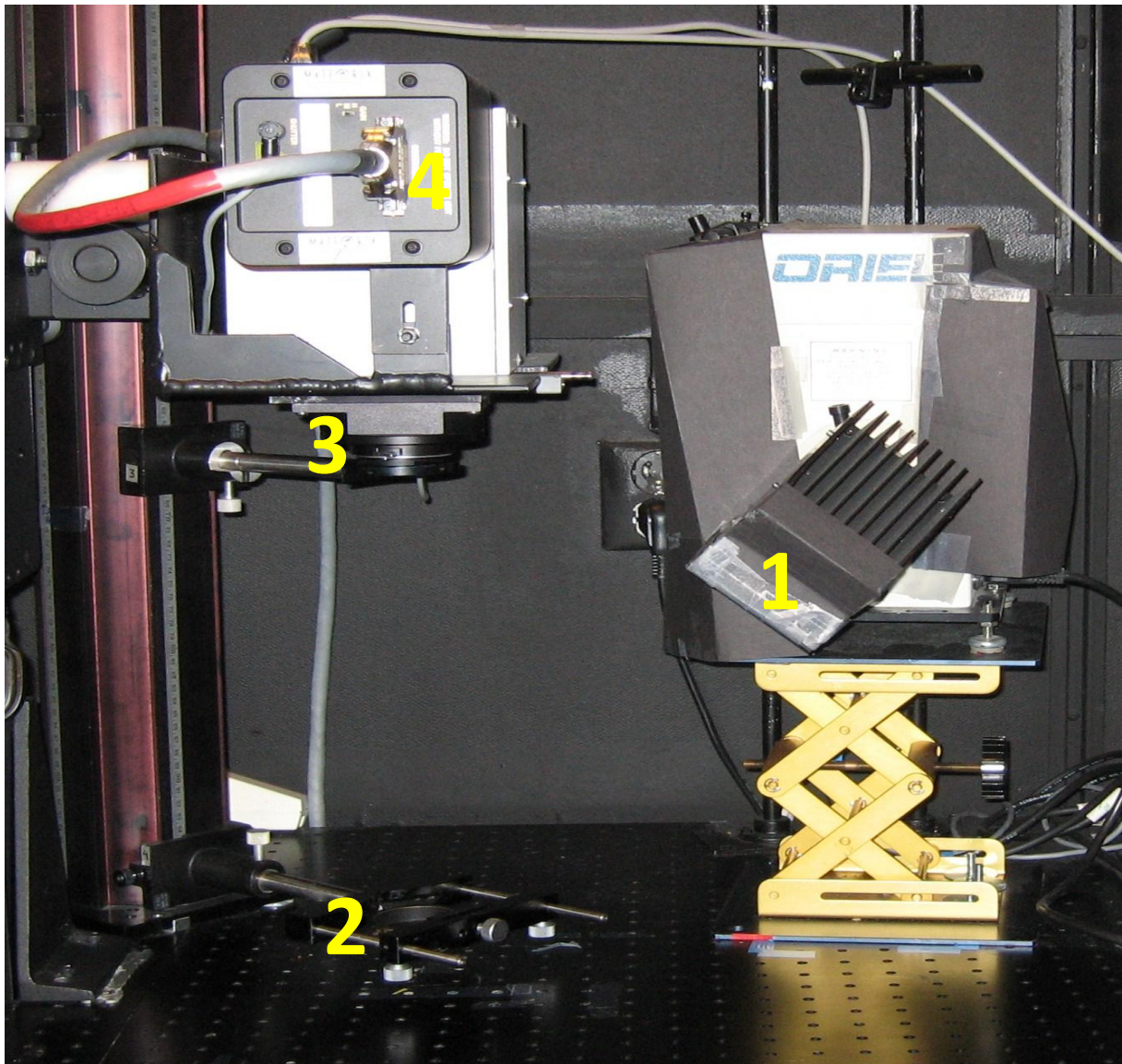


Bilde 4. Lyskassen med dramsglass

Fluorescenspektroskopi

Melken til fluorescensspektroskopi ble pipettert opp i runde, flate, svarte plastkvetter, med en diameter på 5 cm og en høyde på ca 1 cm. Fluorescenslyset ble detektert i området 400 - 750 nm og prøvene ble eksitert ved 382 nm og 410 nm. Eksitasjon ved 382 nm har tidligere gitt gode resultater for måling av lipid oksidasjon i meieriprodukter. 382 nm har tidligere blitt brukt til å måle oksidasjonsprodukter, mens 410 nm er best egnet til å måle nivået av fotosensitiserne protoporfyrin, hematoporfyrin og klorofyllderivater (Veberg et al. 2006, Wold et al. 2005). Eksitasjons-lyset ble produsert av en 300 W Xenon lampe (Oriol 6258, Oriol Corporation, Stratford, CT) og passerte gjennom et interferens filter (382 nm -Oriol 59920 og 410 nm Oriol 59295) med en båndvidde på 10 nm. Lyset traff prøvene med en vinkel på 45 °. Spektrene ble registrert i en spektrograf (Acton SP – 150. Acton Research Corporation, Acton, MA) som var koblet til et sensitivt CCD-kamera (Charge Coupled Device) (Roper Scientific NTE/CCD – 1340/400 – EMB, Roper Scientific, Trenton, NJ). Det ble brukt to cut-off filtre, henholdsvis 400nm (Melles Griot 03FCG049) for eksitasjon på 382 nm og 475 nm (Melles Griot 03FCG068) for eksitasjon på 410 nm. Disse ble plassert foran detektoren for å hindre eksitasjonslyset som ble reflektert fra prøven. Eksponeringstid var 1,5 s. For å sikre et stabilt lys, ble strålingsintensitet ved 440 nm (eksitasjon 382 nm) målt fra en stabil fluorescens standard av plastikk (Ciba, Basel, Switzerland) før og etter målingene. Spektrene

ble ikke utsatt for noen form for forbehandling før analysen. Bilde 5. Viser fluorescens instrumentet.



Bilde 2. Fluorescensinstrumentet

1 = Xenonlampe, 2 = Prøvestativ, 3 = cut off filter 4 = detektor + spektrometer

Peroksidtest

Peroksidtest ble utført som beskrevet av Østdal et al. (2000).

En jern(2)tiocyanat løsning ble laget på forhånd og krevde tre basis-løsninger.

Løsning 1: 0,4 g barium klorid (dihydrat) ble løst i 50 ml vann og blandet med 0,5 g jern(2)sulfat løst i 50 ml vann. Blandingen ble tilsatt 2 ml 10M HCl og deretter filtrert. Filtratet (væsken) ble brukt videre.

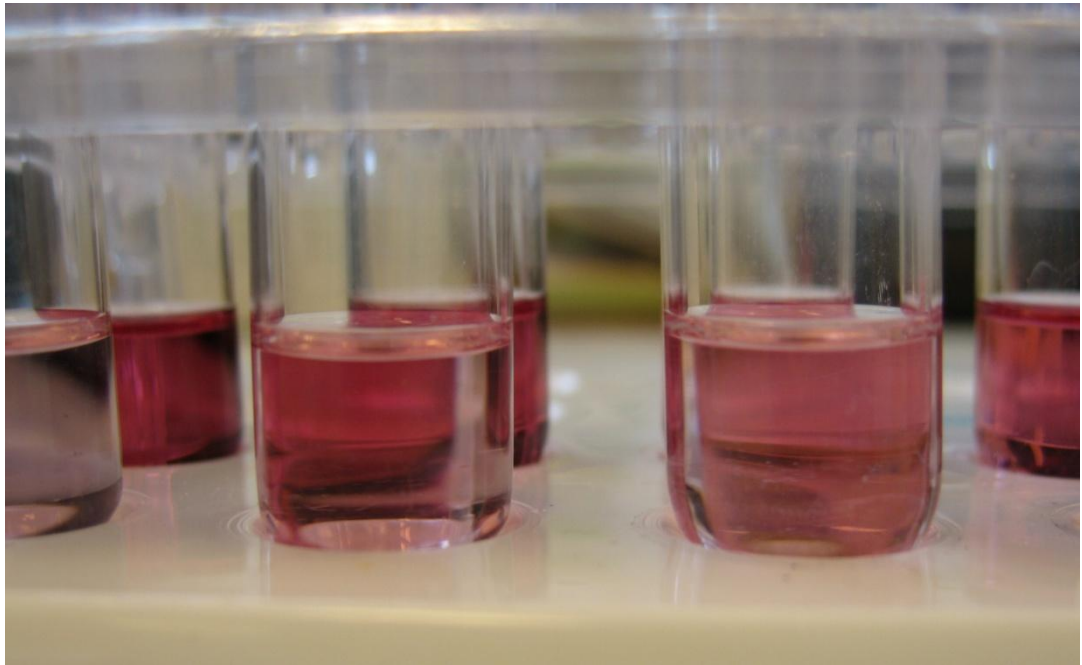
Løsning 2: 3 g ammonium tiocyanat ble løst i 10 ml vann.

Løsning 3: 50 ml kloroform ble blandet med 50 ml metanol.

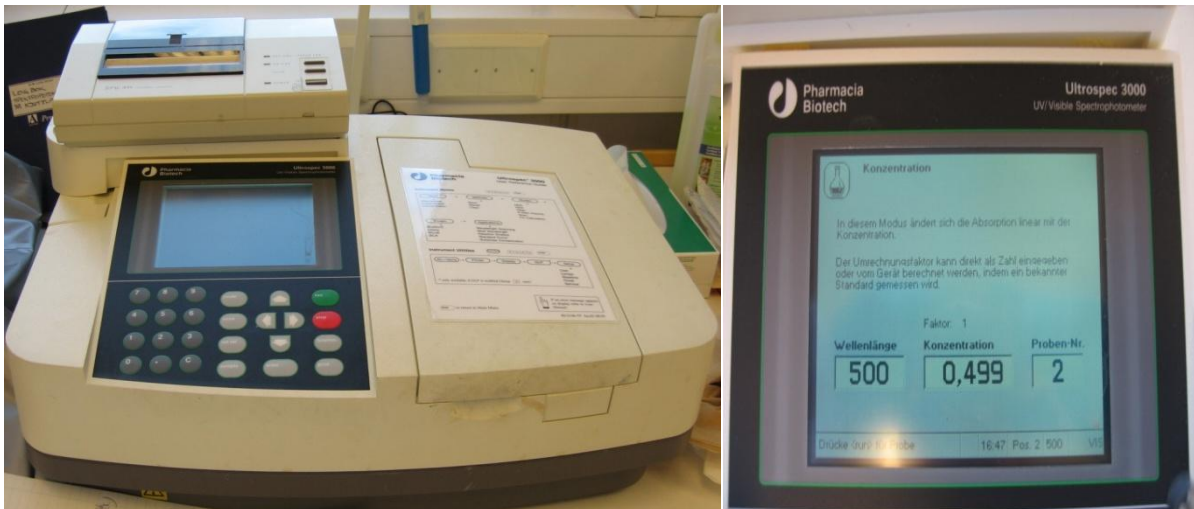
Jern(2)tiocyanat løsning: 500µl av løsning 1 + 500 µl av løsning 2 ble blandet, og deretter fortynnet til 50 ml med løsning 3.

Metoden:

1. 2 ml melk ble tilsatt 2 ml metanol og blandet med en vortexmikser.
2. Løsningen ble tilsatt 4 ml kloroform og denne ble omhyggelig blandet ved bruk av en vortexmikser i 30 sek.
3. Løsningen ble sentrifugert ved 1500g i 10 min.
4. Den nedre fasen (kloroform fasen) ble pipettert ut og blandet med 1 ml jern(2)tiocyanat løsning. Løsningen danner raskt en svak til sterk rosa farge (bilde 6).
5. Prøvene reagerte i 5 min i romtemperatur (bilde 6) og ble deretter målt spektrofotometrisk ved 500 nm. Før måling i spektrofotometeret (bilde 7) (Ultrospec 300, Pharmacia Biotech), ble prøvene overført til glass-kuvetter (plast løses opp av kloroformen). Hver prøve ble målt sammen med sin 0t-prøve (referanse) for kalibrering.



Bilde 6. Prøver rett før måling i spektrofotometer. Legg merke til den karakteristiske fargen.



Bilde 7. Spektrofotometer - skjermbilde.

Statistiske metoder

Dataene ble analysert ved hjelp av en proc mixed prosedyre i SAS 9.2.

Resultater presenteres som lsmeans, standardfeil for differansen (SED), *p*-verdi eller ***

Etter følgende modell for analyser av ytelse etc:

$$Y_{ijkl} = \mu + K_i + B_j + P_k + (BP)_{jk} + e_{ijkl}$$

Der

μ er gjennomsnittet av alle observasjonene,

K_i er fast effekt av kovariat (dette leddet faller bort og indeks "i" for variabler som ble analysert uten kovariat: fôropptak, fettsyresammensetning og vitaminer i melk),

B_j er fast effekt av beitetype,

P_k er fast effekt av periode,

β_{vjk} er fast effekt av samspillet mellom beitetype og periode

e_{ijkl} er tilfeldige feil.

Statistisk modell for analyser av botanisk sammensetning og analyser av beiteprøver

$$Y_{ij} = \mu + B_i + e_{ij}$$

B_i er fast effekt av beitetype,

Statistiske modell: beitetype, periode, fettsyrer, lys,.. tallene i alle tabeller er LS means, standard feil er SED (Standard Error of Difference)

Statistisk analyse utført i Unscrambler

Prinsippal komponent analyse (PCA) og partial least squares regression (PLSR) ble utført i programmet The Unscrambler (v.9.8, Camo AS, Oslo, Norway)

3.3 Resultater

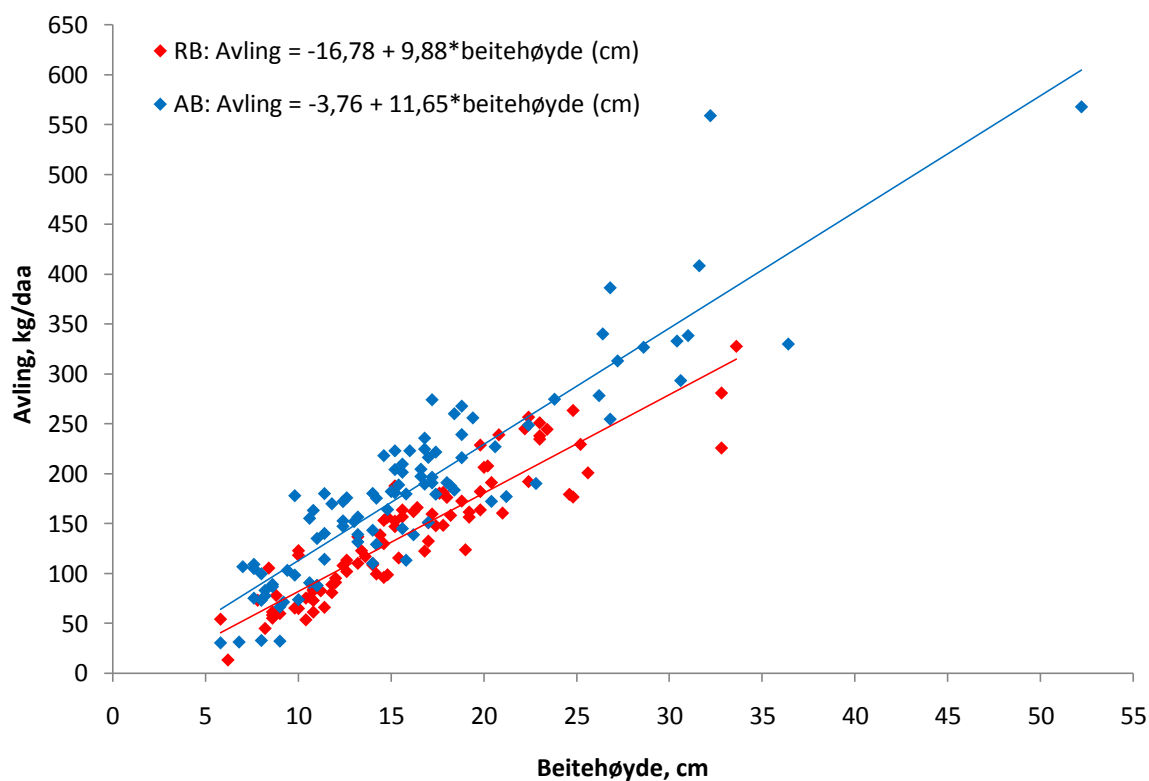
3.3.1 Avling

Begge beitetypene hadde en avlingstopp i periode 2 (tabell 7). AB hadde høyere avling i periode 2 sammenliknet med RB, noe som gav en høyere gjennomsnittsverdi for AB gjennom hele forsøksstiden.

Tabell 7. Avling i kg ts/daa for rødkløvergrasbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB)

	RB	AB
Periode 1	124,4	115,3
Periode 2	184,5	271,3
Periode 3	153,3	167,4
Gjennomsnitt for hele forsøksstiden	154,0	185,7

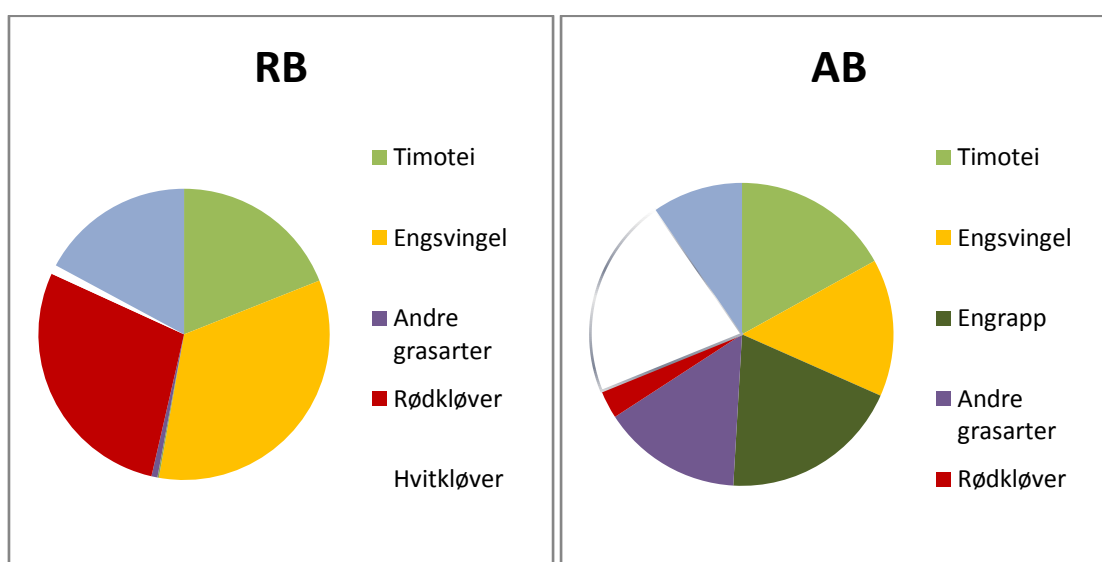
Ved samme beitehøyere hadde AB noe høyere avlinger enn RB (Figur 10).



Figur 10. Korrelasjon mellom beitehøyde og avling på rødkløverbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB).

3.3.2 Botanisk sammensetning i de to beitetypene.

Beregningene for hele forsøksperioden viser at det var signifikant forskjell mellom de to beitetypene med hensyn til innholdet av rødkløver og hvitkløver (figur 11), idet AB hadde mer hvitkløver og RB hadde mer rødkløver. AB hadde i tillegg signifikant høyere andel av andre grasarter enn RB. Andelen rødkløver steg kraftig fra periode 1 til periode 2 (tabell 8) i RB. RB hadde en høy andel ugress (for det meste gjetertaske) i periode 1.



Figur 11. Botanisk sammensetning for rødkløvergrasbeite (RB), og botanisk allsidig beite (AB). Gjennomsnitt for alle periodene.

Tabell 8. Botanisk sammensetning (%) i rødkløvergrasbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB) i forsøksperiode 1, 2 og 3

	Timotei	Engsvingel	Engrapp	Andre grasarter	Rødkløver	Hvitkløver	Andre urter*
RB 1	19,8	22,6	0,5	0,0	13,2	0,7	43,2
RB 2	19,5	37,7	0,0	1,5	35,0	0,7	5,6
RB 3	17,7	41,1	0,0	0,5	36,5	1,7	2,6
AB 1	7,0	4,7	43,2	17,2	0,0	17,5	10,5
AB 2	18,8	20,5	10,7	12,9	7,7	23,8	5,5
AB 3	25,1	18,9	4,0	14,6	1,4	23,0	13,0

* Mest gjetertaske, tunbalderbrå og balderbrå på RB og høymole og løvetann på AB.

3.3.3 Kjemisk analyse av fôret

Det var ingen signifikant forskjell i kjemisk innhold mellom beitetypene (tabell 9), men RB hadde et noe høyere innhold av fett enn AB. AB hadde et noe høyere sukkerinnhold (nfc) enn RB. Begge beitetypene hadde en høy fordøyelighet av organisk materiale (ivtd) og et høyt innhold av råprotein (cp). Energi innholdet var bra i begge beitetypene, men forandret seg noe idet RB gikk opp i periode 2 og AB gikk ned i periode 2 (tabell 10).

Tabell 9. Kjemisk sammensetning i rødkløvergrasbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB), samt kraftfôret som var likt i begge beitegruppene. (n = 3). Gjennomsnitt for periodene.

	Beiteprøver				Kraftfôrprøver	
	RB	AB	SED	p beite ¹		Stdav
TS % (varm utveiging)	19	21	2,2	NS	89	0,0
CP (råprotein) g/kg TS	190	180	22,2	NS	119	2,1
ADF (syreløsl fiber) g/kg TS	267	291	20,6	NS	53	5,5
NDF (nøytralt løsl fiber) g/kg TS	474	472	25,7	NS	167	3,8
CF (råfett) g/kg TS	43,0	29,0	13,50	NS	25,7	3,06
NEL i FEm	0,90	0,92	0,021	NS	1,02	0,016
OM-1 aske g/kg TS	92,9	83,2	4,28	NS	5,6	0,11
OMd in Vitro % av TS	88,0	88,7	2,11	NS	93,0	1,00
NDFd % (ford etter 48 t)	74,7	76,3	2,75	NS	58,7	6,66
NFC (sukkerinnhold) g/kg TS	243	274	17,0	NS	65	0,2
α-tokoferol (Vit.E), mg/kg TS	77,2	70,4	5,40	NS	51,5	4,0

¹ * = 0,05 < P < 0,01, ** = 0,01 < P < 0,001, *** = P < 0,001, NS = ikke signifikant, (*) = 0,10 < P

Tabell 10. Fôrenhetskonsentrasjon periodevis for rødkløvergrasbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB)

NEL, FEm/kg ts	RB	AB
Periode 1	0,87	0,92
Periode 2	0,92	0,89
Periode 3	0,89	0,94

3.3.4 Beiteopptak

Beiteopptaket per ku ble ved hjelp av NorFor Plan (2009) estimert til 14,8 kg ts/dag på RB, og 14,9 kg ts/dag på AB (tabell 11). Ved bruk av beitehøydemåler fikk en estimert et lavere beiteopptak på RB (14,2 kg ts/dag) og et høyere opptak på AB (16,5 kg ts/dag), sammenliknet med beregningene i NorFor Plan.

RB hadde en svak vektreduksjon (-74 g/d), mens AB hadde en liten vektøkning fra forsøksstart til slutten av periode 3 (+ 50 g/d) ($p = 0,10$). Det var liten forskjell i holdet på dyra og heller ingen forskjell i holdendring (tabell 6). Beiteopptaket estimert etter NorFor Plan (2009) var i gjennomsnitt likt for de to beitegruppene og holdt seg ganske stabilt gjennom forsøksperioden med en liten økning i periode 2 (tabell 12).

Tabell 11. Fôropptak, vektendring og hold gjennom forsøksstiden på rødkløvergrasbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB)

Variabel	RB	AB	SED (beite)	p beite	p periode	p beite * periode
Beiteopptak ³ , kg ts/d	14,8	14,9	0,48	NS	**	NS
Kraftfôropptak, kg ts/d	2,67	2,67				
Tot. Fôropptak, kg ts/d	17,5	17,6	0,48	NS	**	NS
Vektendring, g/dag	-74	+50	68,3	(*)		
Hold endr. Poeng/ 100 d	0,09	0,11	0,127	NS		

¹ Ved forsøksstart.

² Fem poeng skala med 0,25 poeng intervaller.

³ Etter NorFor Plan (2009)

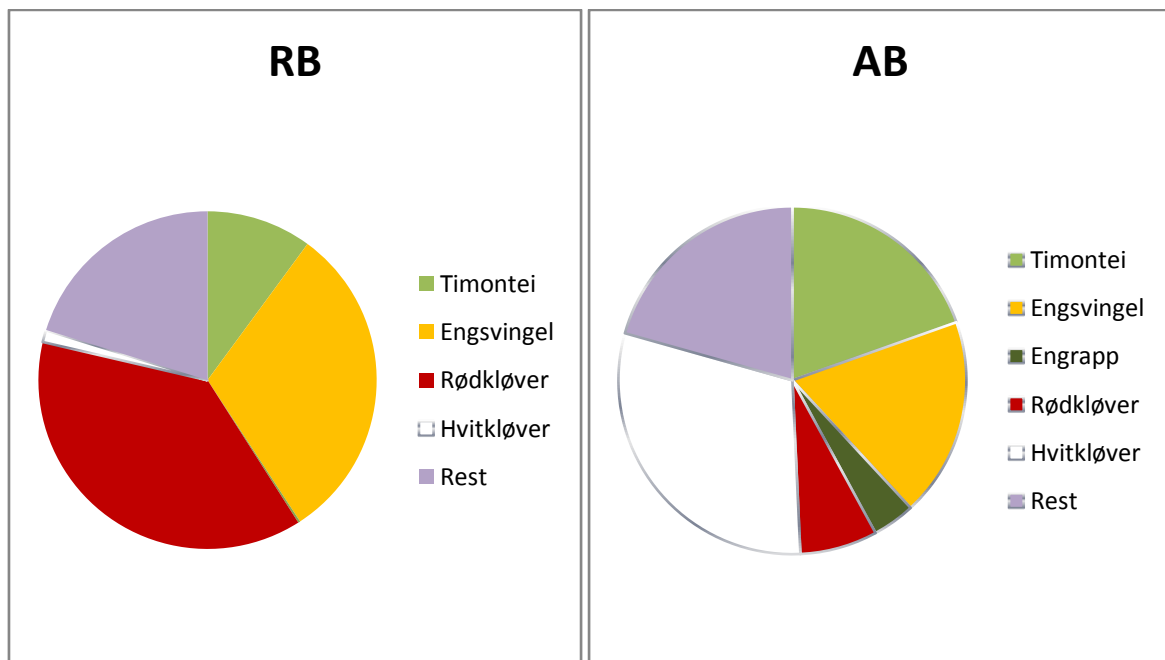
* = 0,05 < P < 0,01, ** = 0,01 < P < 0,001, *** = P < 0,001, NS = ikke signifikant (*) = 0,10 < P

Tabell 12. Utviklingen av beiteopptak (NorFor, 2009) i kg ts/d gjennom forsøksperioden for rødkløvergrasbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB)

Beitetype	Periode 1	Periode 2	Periode 3	Gjennomsnitt av perioder
RB	14,7	15,2	14,6	14,8
AB	14,6	15,1	15,0	14,9

3.3.5 Botanisk sammensetning av beiteopptaket.

Resultatene fra beiteopptaket (figur 12) viser at det var en signifikant ($p = 0,03$) forskjell mellom gruppene i opptak av hvitkløver, mens det var en tendens til forskjell i opptak av rødkløver. Det er opplagt mer rødkløver i RB siden dette ble sådd. Kyrne beiter selektivt og dette gjør at det er noe forskjell mellom botanisk sammensetning før og etter avbeiting.



Figur 12. Botanisk sammensetning av beiteopptak fra rødkløvergrasbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB).

3.3.6 Fettsyrer i fôret

Andelen mellomlange fettsyrer (C12-C17) var signifikant høyere i AB sammenliknet med RB, mens andelen lange fettsyrer (\geq C18) var signifikant høyere i RB sammenliknet med AB (tabell 13). Det var en høyere andel enumettede fettsyrer i AB sammenliknet med RB, og en høyere andel flerumettede fettsyrer i RB sammenliknet med AB, men dette var ikke signifikant. Andelen mettede fettsyrer var noe høyere i RB enn AB, men dette var ikke signifikant. Det ble funnet en tendens til et høyere innhold av C18:3n-3 i RB sammenliknet med AB, mens nivået av C18:2n-6 var signifikant høyere i AB enn RB.

Tabell 13. Fettsyresammensetning (FS) i prøver fra rødkløvergrasbeite (RB), botanisk allsidig beite (AB) (n=6), og kraftfôr, % av totalt fettinnhold n=3.

Fettsyrer	Fôrprøver fra beite				Kraftfôr, bygg med mineraler	
	RB	AB	SED, beite	p beite		Standard avvik
C12:0	0,16	0,21	0,039	NS	0,05	0,019
C13:0	0,19	0,20	0,039	NS	0,00	0,000
C14:0	0,43	0,53	0,076	NS	0,37	0,015
C14:1	0,50	0,67	0,056	(*)	0,00	0,000
C15:0	0,17	0,21	0,098	NS	0,04	0,004
C16:0	14,03	16,47	0,827	*	24,34	0,267
C16:1t11	0,88	1,09	0,174	NS	0,05	0,002
C16:1c9	0,16	0,27	0,088	NS	0,19	0,006
C18:0	1,56	1,83	0,119	(*)	1,18	0,118
C18:1t11	2,77	3,53	0,290	NS	11,86	0,760
C18:2n-6	17,05	19,05	0,417	*	53,23	1,077
C18:3n-3	57,84	51,52	2,511	(*)	5,69	0,127
C18:2t10	0,12	0,00	0,006	**	0,00	0,000
C20:0	0,56	0,70	0,115	NS	0,20	0,011
C20:1	0,13	0,09	0,043	NS	0,73	0,008
C22:0	0,89	1,10	0,224	NS	0,29	0,013
C24:0	1,00	1,16	0,116	NS	0,18	0,015
Mettede FS	18,98	22,40	1,440	(*)	0,70	0,034
Enumettede FS	5,31	6,60	0,306	(*)	14,20	0,800
Flerumettede FS	75,71	70,99	1,861	(*)	59,14	1,200
n6:n3 FS	0,31	0,37	0,026	NS	9,36	0,056
Andel mellomlange C12-C17 FS, %	16,93	20,04	0,971	*	25,10	0,328
Andel lange >C18 FS, %	83,07	79,96	0,971	*	74,90	0,328

* = 0,05 < P < 0,01, ** = 0,01 < P < 0,001, *** = P < 0,001, NS = ikke signifikant (*) = 0,10 < p

SED = Standard Error of Difference

3.3.7 Kjemisk sammensetning i melka

Det var ingen forskjell mellom gruppene med tanke på avdrått, protein innhold og fett innhold (tabell 14). Det ble funnet høyere innhold av α -tokoferol og retinol (tendens) i melk fra RB enn AB. Protein og urea innholdet steg utover i forsøksstiden (tabell 15).

Tabell 14. Melkeytelse og melkesammensetning hos kyr på rødkløvergrasbeite (RB) eller botanisk allsidig beite (AB). Gjennomsnitt av periodene.

Variabel	RB	AB	SED (beite)	p beite	p periode	p beite * periode
Melk, kg/d	24,6	24,9	0,72	NS	***	NS
EKM, kg/d	23,8	23,8	0,76	NS	NS	NS
Fett, %	3,77	3,72	0,105	NS	(*)	NS
Protein, %	3,36	3,32	0,062	NS	***	**
Laktose, %	4,57	4,58	0,041	NS	NS	NS
FFA IR, meq/l	0,49	0,62	0,123	NS	NS	NS
Urea, mmol/l	4,33	4,49	0,218	NS	***	**
Retinol mg/l	1,03	0,89	0,074	(*)	NS	NS
α -tokoferol mg/l	3,01	2,64	0,124	*	***	(*)

EKM = Ytelse x (0,01 + 0,122 x melkefettprosent + 0,077 x proteinprosent + 0,053 x laktoseprosent)

* = 0,05 < P < 0,01, ** = 0,01 < P < 0,001, *** = P < 0,001, NS = ikke signifikant (*) = 0,10 < p

Tabell 15. Utvikling i protein og urea innhold i melk fra rødkløvergrasbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB)

Perioder	RB		AB	
	Protein, %	Urea, mmol/l	Protein, %	Urea, mmol/l
Periode 1	3,08	2,5	3,28	3,2
Periode 2	3,19	5,2	3,24	4,4
Periode 3	3,62	5,3	3,62	5,8

3.3.8 Fettsyrer i melk

Det var en tendens til mer av de enumetta fettsyrene i melk fra rødkløver beite (Tabell 16). Analysene viser også at melk fra RB ligger noe høyere enn allsidig beite i andel flerumettede fettsyrer, samt høyere n-6:n-3 forhold, men dette var ikke signifikant. RB hadde en signifikant høyere andel av C17:1 og C18:1t11, samt en tendens til høyere andel av C18:0 enn allsidig beite. De fleste fettsyrene viste signifikante forskjeller med hensyn til periode. Noen (C12:0, C13:0, C17:1) viste også signifikante forskjeller når vi så på samspillet mellom beite og periode.

Tabell 16. De viktigste fettsyrene i melk, % av totalt fettinnhold

Fettsyrer	Rødkløver Beite	Allsidig beite	SED beite	P. Beite-	P. Periode-	P. Samspill beite/periode	P kovariat
c4:0	3,03	2,82	0,125	NS	(*)	NS	NS
c6:0	2,16	2,05	0,067	NS	NS	NS	NS
c8:0	1,46	1,39	0,050	NS	(*)	NS	*
c10:0	3,27	3,19	0,124	NS	NS	NS	NS
c12:0	3,73	3,81	0,159	NS	(*)	*	NS
c13:0	0,10	0,10	0,010	NS	***	***	NS
c14:0	12,25	12,55	0,270	NS	**	(*)	NS
c14:1	1,00	1,22	0,130	NS	***	NS	***
c15:0	1,14	1,22	0,105	NS	NS	NS	NS
c16:0	28,83	30,92	1,094	NS	*	NS	*
c16:1t11	1,34	1,52	0,154	NS	(*)	NS	NS
c17:1	0,36	0,34	0,008	*	***	*	NS
c18:0	11,41	9,96	0,574	(*)	NS	NS	(*)
c18:1	19,73	18,75	0,712	NS	**	NS	NS
c18:1t11 (vaccensyre)	0,58	0,44	0,051	*	NS	NS	NS
c18:2n-6	1,08	1,00	0,120	NS	(*)	NS	NS
c18:2c9t11 CLA	2,01	1,85	0,124	NS	***	NS	*
c18:3n-3	0,97	0,99	0,073	NS	**	NS	**
c22:5 DPA	0,13	0,11	0,027	*	NS	(*)	NS
Mettede fettsyrer	66,73	68,37	1,027	NS	**	NS	NS
Enumetta fettsyrer	28,34	26,92	0,814	(*)	*	NS	NS
Flerumetta fettsyrer	4,93	4,71	0,316	NS	*	NS	(*)
n6:n3	2,02	1,88	0,121	NS	***	NS	NS

* = 0,05 < P < 0,01, ** = 0,01 < P < 0,001, *** = P < 0,001, NS = ikke signifikant, (*) = 0,10 < p

SED= Standard Error of Difference

3.4 Oksidativ stabilitet

3.4.1 Peroksider

Tabell 17 viser gjennomsnittlige peroksidverdier for de tre periodene for melk fra henholdsvis RB og AB. Peroksidtesten viser ingen forskjell mellom de to beitegruppene, men lys hadde klar effekt.

Tabell 17. Peroksidverdier (absorpsjon ved 500 nm) for melk fra rødkløvergrasbeite (RB) og botanisk allsidig beite (AB).

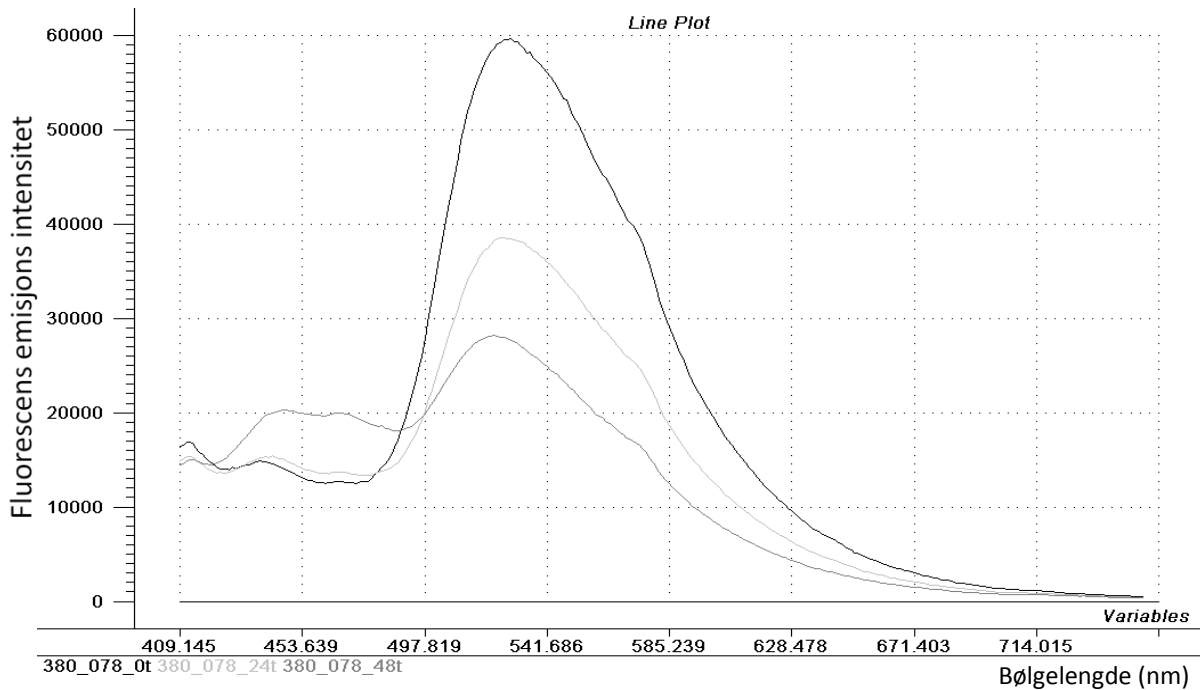
	<u>RB</u>		<u>AB</u>		SED	<i>p</i> beite	<i>p</i> lys	<i>p</i> beite * lys
Peroksidverdier	24 t	48t	24 t	48 t				
	0,225	0,457	0,290	0,456	0,0414	NS	***	NS

SED (Standard Error of Difference) gjelder for beite * lys

***= P < 0,001, NS = ikke signifikant

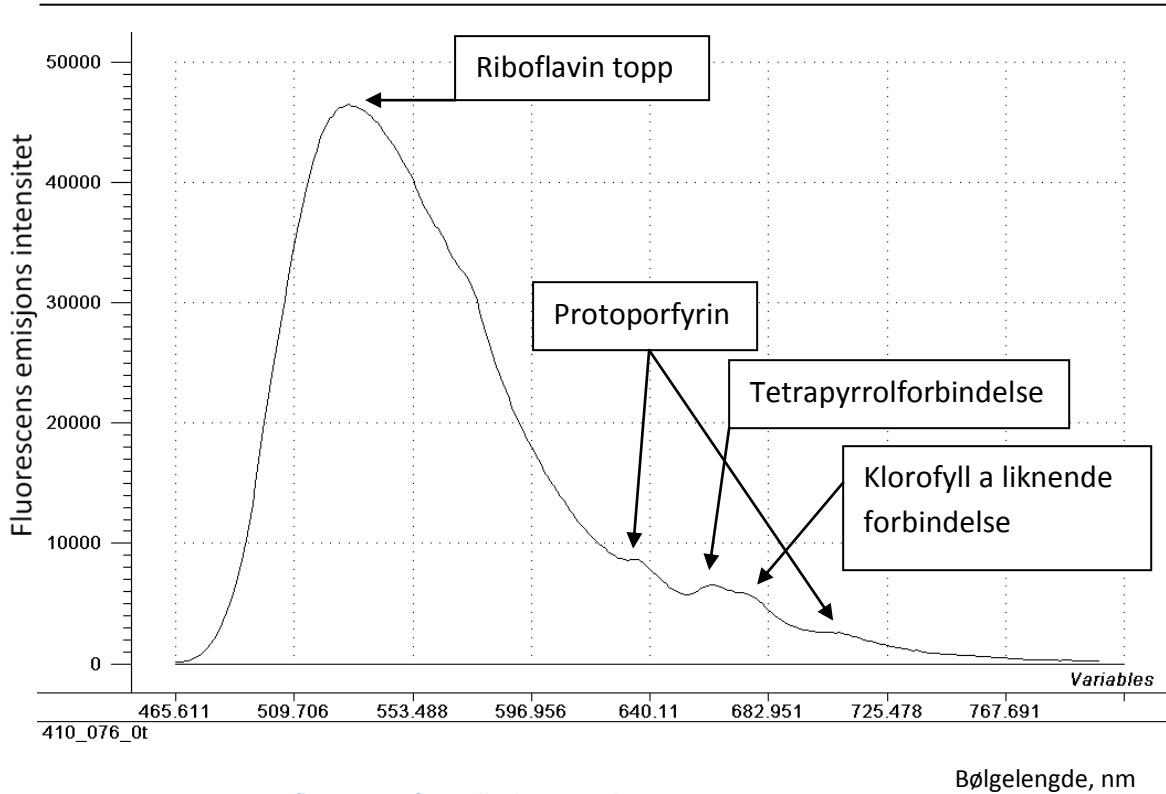
3.4.2 Fluorescensspektroskopi

I figur 13 er det plottet en typisk utvikling av fluorescensspektra av melk som er belyst ved ulik tid (0, 24 og 48 timer). Vi så tydelig at fotosensitiseren riboflavin (topp ved 530 nm) ble brutt ned ved belysning. Protoporfyrin (635 nm), en tetrapyrrolforbindelse (662 nm), og en forbindelse som likner klorofyll a (675 nm) ble også brutt ned ved belysning (figur 4), men disse toppene var ikke så tydelige som riboflavin. Toppene til venstre i spekteret viser området der en forventer å finne oksidasjonsprodukter over tid. En ser at prøven etter 48 timers belysning har en høyere topp enn 0 og 24 timers prøven.



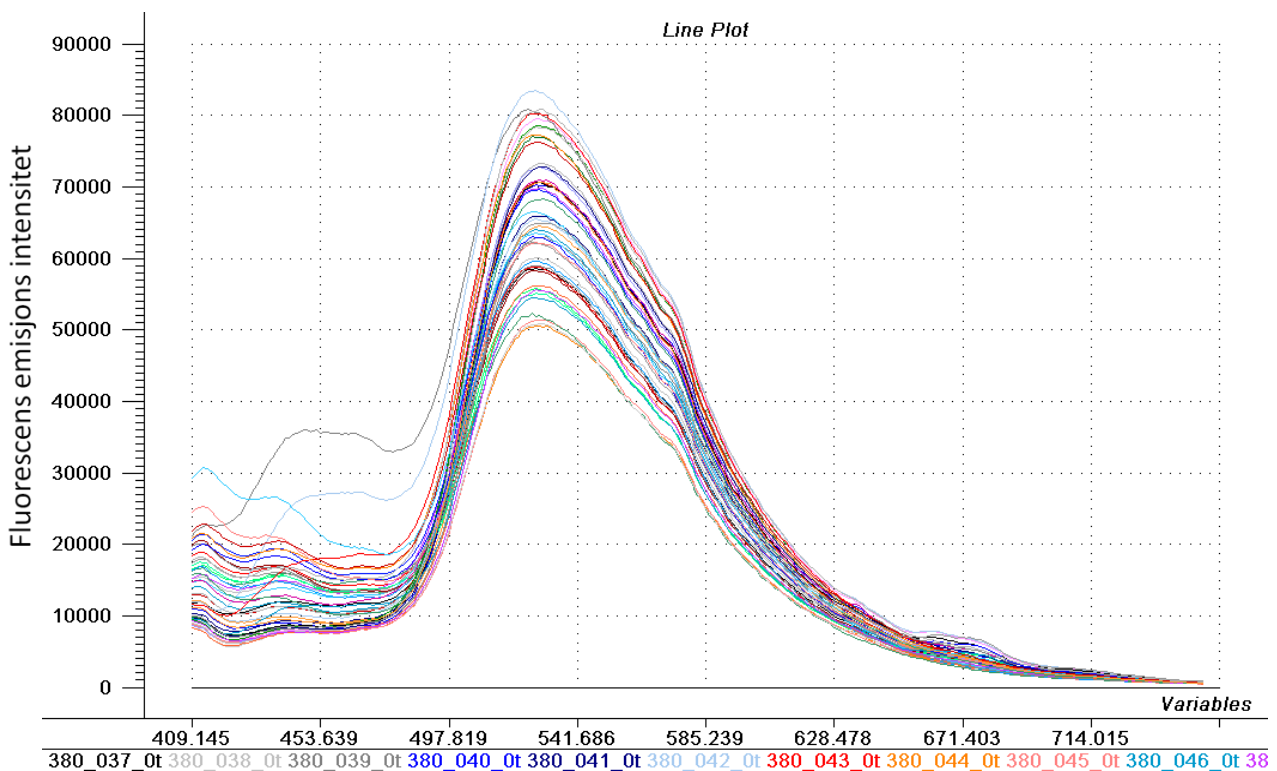
Figur 13. Fluorescensemisjonsspektra (eksitasjon 382 nm) av melk fra rødkløver beite belyst i 0, 24 og 48 timer.

I figur 14 er det plottet spektra av en melkeprøve som er eksitert ved 410 nm. Her kan man tydelig se de ulike fotosensitiserne som er til stede i melken.



Figur 14. Fotosensitisere i fluorescens fra melk eksitert ved 410 nm.

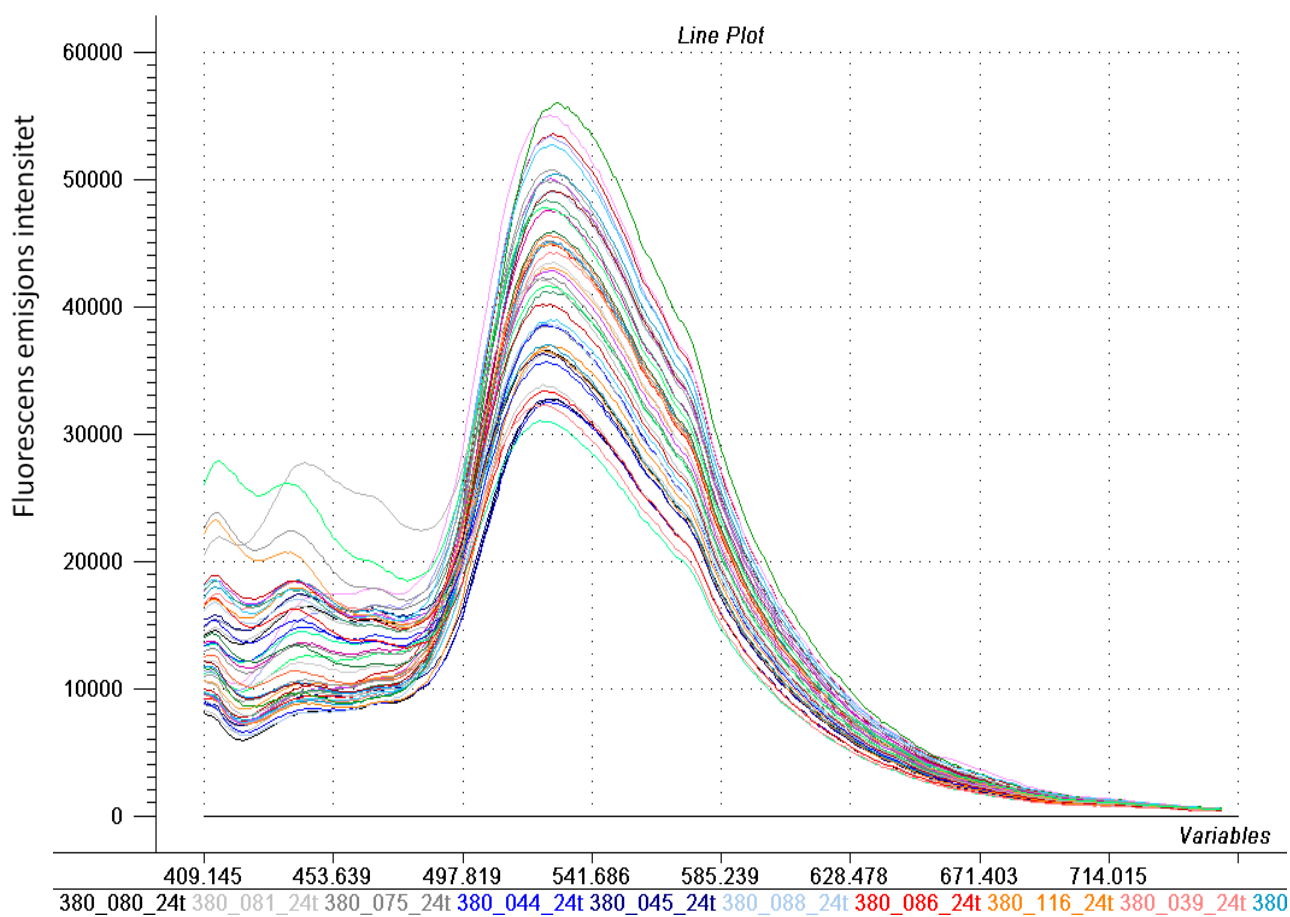
Fluorescensspektra av alle prøvene ved t = 0 er plottet i figur 15. Man kan se her at enkelte av prøvene trolig inneholder en del fluorescerende bakterier (topp i området 420-480 nm).



Figur 15. Fluorescens målinger etter 0 t belysning. Eksitasjon ved 382 nm.

Bølgelengde (nm)

Alle 24 timers prøvene er plottet i figur 16. Vi ser at alle toppene til høyre for riboflavin er brutt ned. Riboflavin toppen er lavere enn ved 0 timers prøvene, men den er likevel svært tydelig.

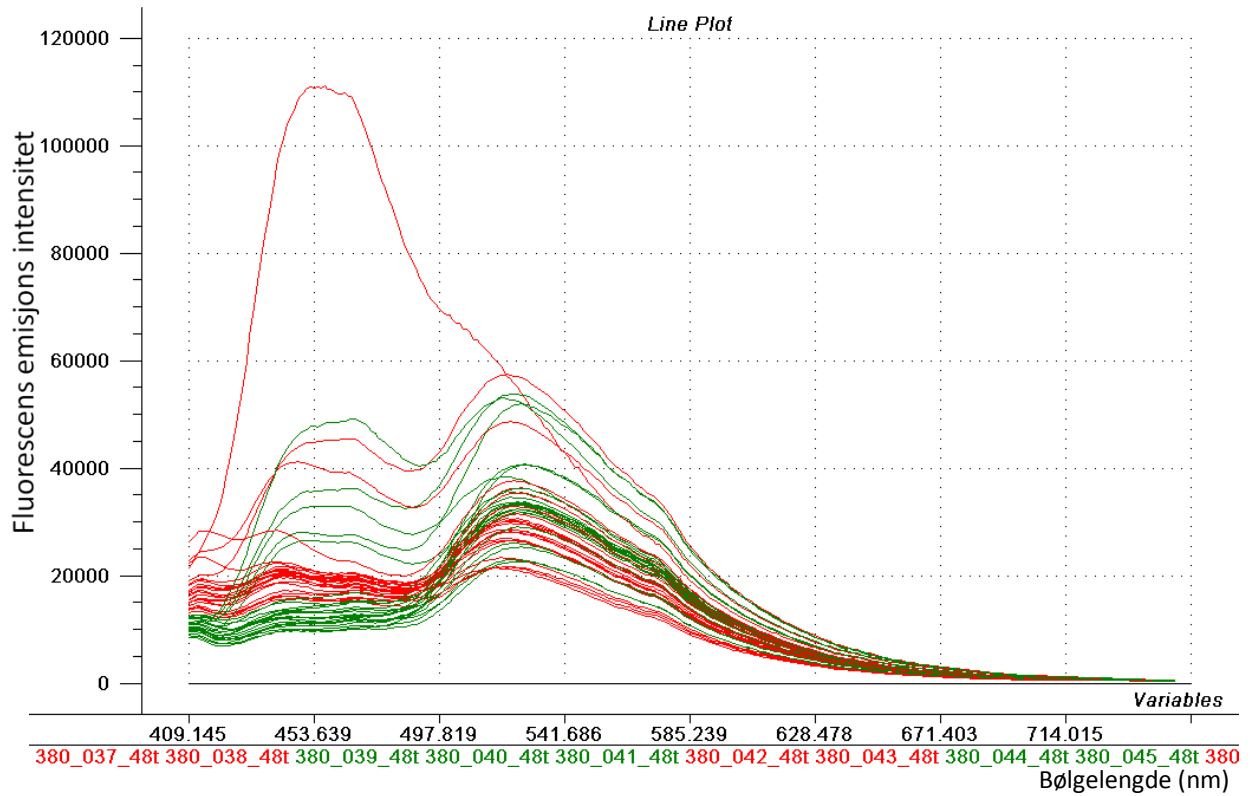


Figur 16. Fluorescens målinger etter 24 t belysning. Eksitasjon ved 382 nm.

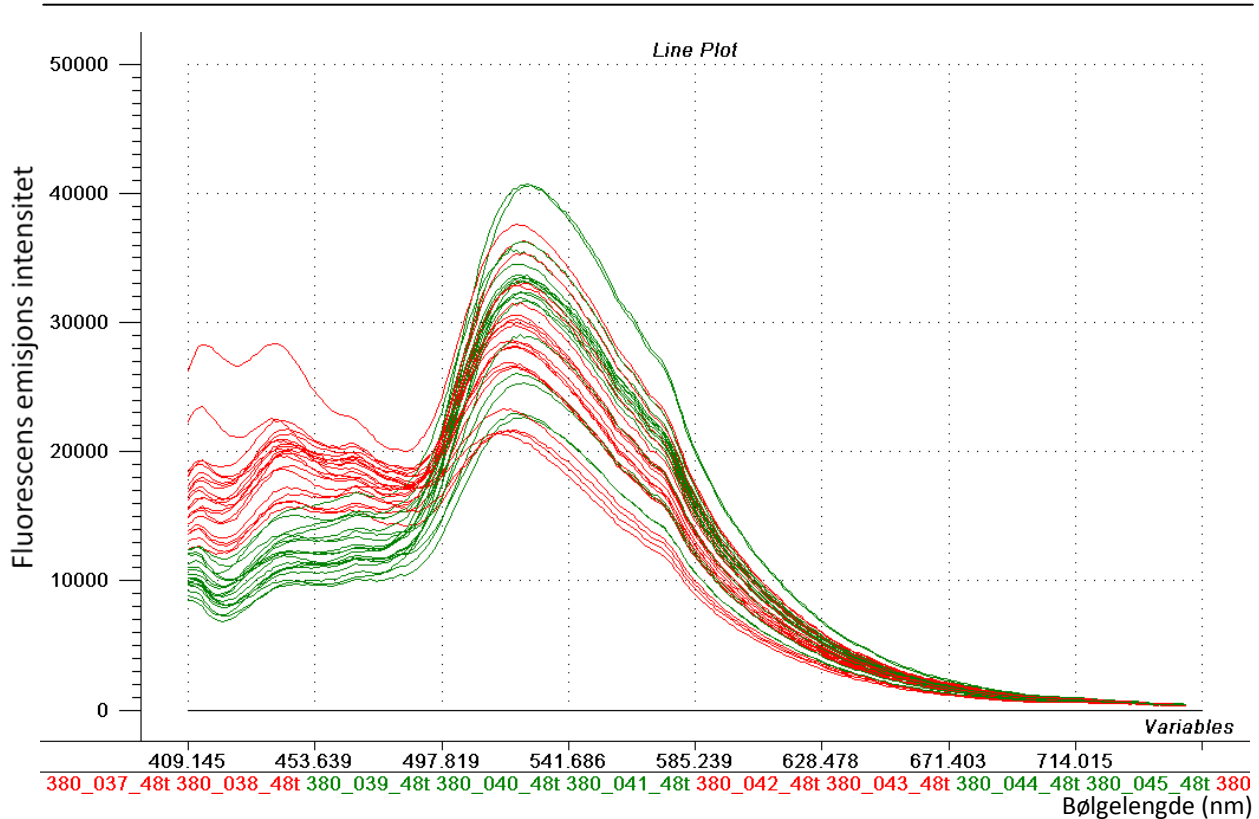
Bølgelengde (nm)

Etter 48 timers belysning (figur 17 og 18) så en forskjell mellom gruppene ved at melk fra RB hadde et høyere nivå i området vi forventet å finne oksidasjonsprodukter enn melk fra AB. Noen prøver skilte seg ut med svært høye nivåer i området 400-500 nm (figur 17) Dette kan skyldes bakterier. Prøvene ble fjernet for at eventuelle bakterier ikke skulle påvirke resultatet. Følgende 0 timers prøver ble fjernet; 109, 112, 113 og 124, følgende 48 timers prøver ble også fjernet; 109, 112, 113, 116, 120, 121, 123, 124. Prøvene ble lagt merke til under analysen, men hadde fått samme behandling som de andre prøvene og ble analysert

straks. Figur 18 viser spektrene uten prøvene med antatte bakterier og her ser en tydelig at RB har høyere topper i området 400-500 nm enn AB.

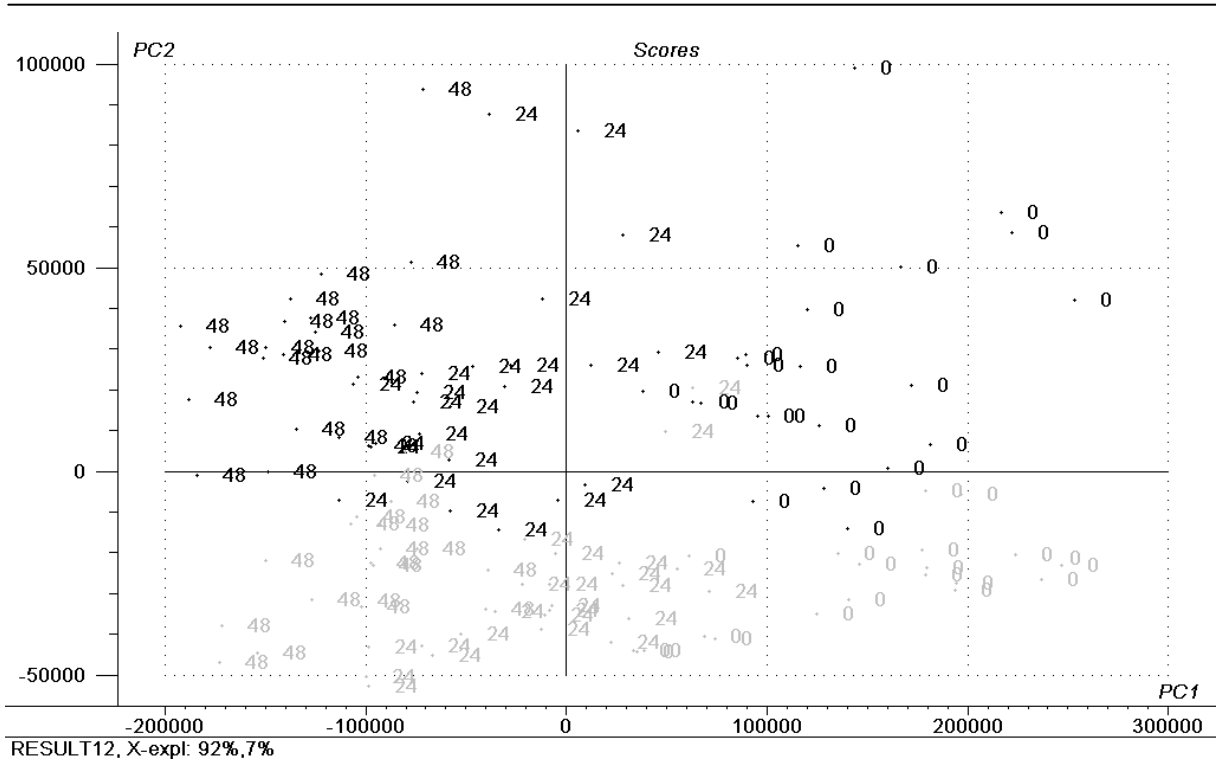


Figur 17. Fluorescensmålinger etter 48 t belysning inkludert prøvene med mistanke om bakterier. Eksitasjon ved 382 nm. Rød farge er rødkløvergrasbeite, grønn farge er botanisk allsidig beite.

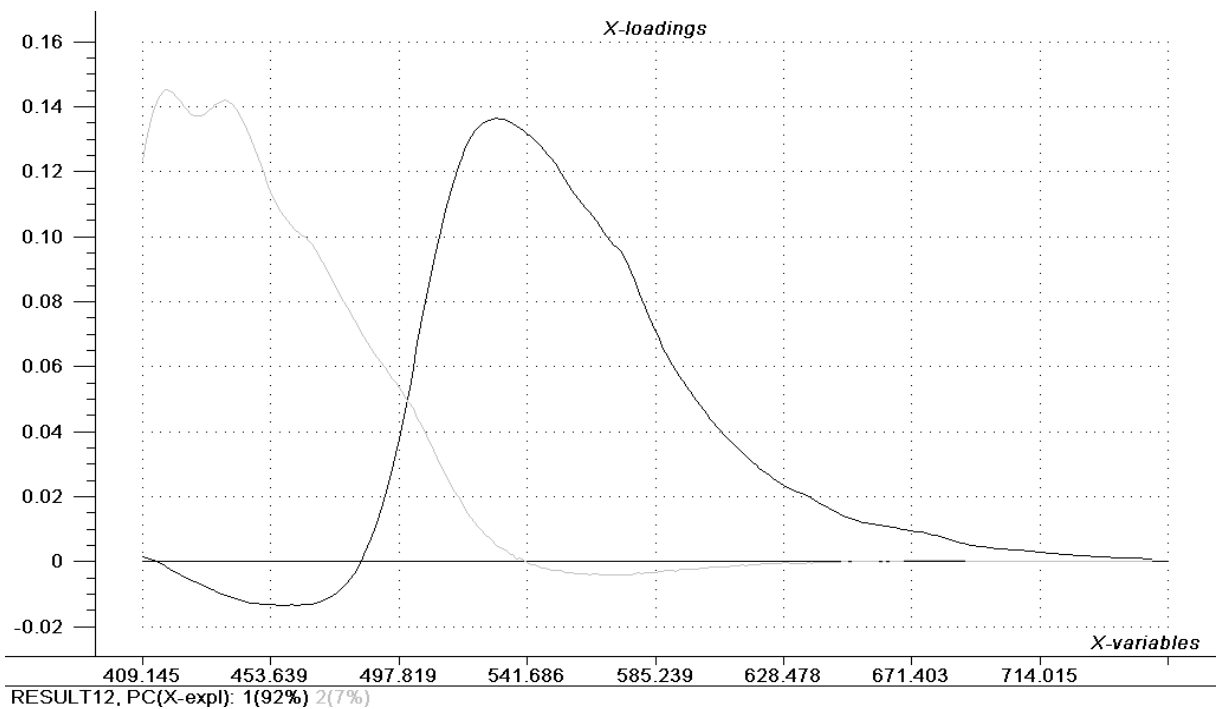


Figur 18. Fluorescensmålinger etter 48 timers belysning Her er prøvene med mistanke om bakterier fjernet. Eksitasjon ved 382 nm. Rød farge er rødkløvergrasbeite, grønn farge er botanisk allsidig beite.

Med utgangspunkt i å finne ut om melk produsert på RB var forskjellig fra melk produsert på AB ble det gjennomført en prinsippal komponent analyse (PCA) av fluorescensspektra. I scoreplottet (figur 19) er prinsippalkomponent 1 (PC1) som forklarer 93 % av variasjonen, plottet mot PC2 som forklarer 7 % av variasjonen. En ser at prøvene grupperer seg noe (RB = sort, AB = grå). PC1 kan skille noe på belysningstidene og ut fra ladningsplottet i figur 20, ser vi at denne variasjonen i hovedsak skyldes nedbryting av riboflavin. PC2 skiller noe mellom de to beiten og ut fra ladningen for PC2 ser vi at dette skyldes en forskjell i fluorescensintensiteten i området 410-540, med et maksimum på 440 nm. Utvikling av fluorescerende forbindelser i dette området kan være ulike oksidasjonsprodukter, som for eksempel er dannet mellom aldehyder og aminosyrer (Veberg *et al.* 2006b).



Figur 19. Scoreplott fra PCA som viser PC 1 mot PC 2. RB = svart, AB = grå. Etter belysning ved 0 = 0 t, 24 = 24 t, 48 = 48 t.



Figur 20. Ladningsplott fra PCA som viser de to ladningene. PC1 =svart, PC2 = grå.

For å finne ut om det var en sammenheng mellom fluorescensspektra og peroksidverdi, ble det utført partial least squares regresjoner (PLSR). RB og AB kalkulert separat ga korrelasjon på 0,74 med henholdsvis 2 og 6 komponenter. RB og AB sett under ett ga korrelasjon på 0,71 med 9 komponenter.

4.0 Diskusjon

Flere forsøk har vist at botanisk sammensetning i beite og surfôr har innvirkning på fettsyresammensetning i melk (Steinshamn & Thuen, 2008, Dewhurst et al. 2003a, Van Dorland et al. 2008, White et al. 2001). Dette kan igjen påvirke den oksidative stabiliteten i melkefettet (Al-Mabruk et al. 2004, Havemose et al. 2006).

4.1 Botanisk sammensetning av de to beitetypene.

Det var ut fra visuelle vurderinger som forventet en signifikant høyere andel rødkløver i rødkløvergrasbeite (RB) sammenliknet med botanisk allsidig beite AB). Likevel var det bare en tendens til høyere opptak av rødkløver i RB enn i AB. Dette kan, sammen med resultatene fra fettsyresammensetningen i melk, tyde på at andelen rødkløver i beite var for lavt til å gi en sikker effekt. En annen forklaring kan være at andelen kløver i de to beitene ble overvurdert siden det ikke er tatt noe eksakt mål på dette, men kun er vurdert visuelt. Det er vanskelig å fastslå tørrstoff mengden til kløver da det ofte ser mer ut enn det egentlig er. Botanisk allsidig beite hadde signifikant mer hvitkløver enn RB, samt at andre grasarter utgjorde en signifikant større andel sammenliknet med RB. En kan likevel diskutere om AB i særlig grad var mer allsidig enn RB. Resultatene kunne kanskje blitt tydeligere med en klarere forskjell mellom beitetypene. Rødkløvergrasbeite inneholdt i gjennomsnitt 28 % rødkløver, og kyrne hadde et opptak på 37 % rødkløver på tørrstoff basis gjennom forsøksperioden, mens allsidig botanisk beite inneholdt 21 % hvitkløver i gjennomsnitt og et opptak på 30 % hvitkløver på tørrstoffbasis gjennom periodene. Uheldig tidspunkt ved såing etterfulgt av en vår med tørke kan være en medvirkende årsak til den noe lave andelen rødkløver på beite. Spesielt så vi dette i periode 1. Andelen hvitkløver på AB var normal. De fleste forsøk som har sett på effekten av botanisk sammensetning i grovfôr på fettsyresammensetningen i melk har hatt enten rene bestander av kløver og/eller en høyere andel (40-60 %) kløver sammen med gras enn i dette forsøket. Det er få forsøk der en har sett på botanisk allsidig beite noe som gjør en direkte sammenlikning mellom tidligere forsøk og denne studien vanskelig.

4.2 Kjemisk sammensetning av beiten

Det var ingen signifikante forskjeller i kjemisk sammensetning mellom de to beitetypene, bortsett fra at RB hadde et høyere fettinnhold enn AB. Det ble tatt ut prøver til kjemisk analyse tre ganger gjennom beiteperioden for de to beitetypene noe som gir usikre verdier.

Fordøyeligheten av begge beitetyper var høy gjennom beiteperioden. Fordøyelighet av organisk materiale in Vitro (IVOMD) var i gjennomsnitt 88 % for begge beitetypene i de tre periodene, noe som er svært høyt. Til sammenlikning har svært tidlig slått surfôr av flerårige engvekster med 25 % kløver, 81 % fordøyelighet av OM (Fortabell, 2008). Innholdet av råprotein var også høyt i begge beiten gjennom sesongen og burde ikke være noen begrensning for proteinforsyningen ved de melkemengder som ble observert. Surfôr av hvitkløver har i forsøk vist å gi et høyere innhold av råprotein og et lavere innhold av NDF sammenliknet med surfôr av rødkløver (Dewhurst et al. 2003a, Van Dorland et al. 2006). I dette forsøket var innholdet av råprotein og NDF tilnærmet likt i de to beitetypene. Dette kan tyde på at dersom innholdet av kløverartene hadde vært høyere i de to beitetypene ville en fått større forskjeller mellom beitetypene i råprotein og NDF innhold. Steinshamn og Thuen (2008) begrunnet, i sitt forsøk med surfôr av rødkløvergras og hvitkløvergras, liknende funn med noe lavt innhold av hvitkløver.

Rødkløvergras beite hadde en tendens til et høyere innhold av α -linolensyre sammenliknet med botanisk allsidig beite, mens AB hadde et signifikant høyere innhold av linolsyre sammenliknet med RB. I forsøket til Steinshamn og Thuen (2008) ble det i 2. forsøksår funnet at rødkløvergras surfôr hadde en tendens til et høyere innhold av α -linolensyre sammenliknet med hvitkløver surfôr, men liten forskjell i innhold av linolsyre. Derimot fant Van Dorland et al. (2008) et signifikant høyere innhold av α -linolensyre og en tendens til et høyere innhold av linolsyre i ferskt hvitkløvergras, sammenliknet med ferskt rødkløvergras. Her var imidlertid 40 % av fôret kløver på tørrstoffbasis slik at det ikke kan sammenliknes direkte med våre funn.

Med hensyn til mettede fettsyrer ble det funnet en tendens til mer mettede fettsyrene i AB enn RB noe som i hovedsak skyldes et signifikant høyere innhold av palmitinsyre (C16:0).

4.3 Beitetype og beiteopptak

Resultatene viste at ved bruk av beitehøydemåler hadde kyrne et lavere beiteopptak på RB (14,2 kg ts/dag) og et høyere opptak på AB (16,5 kg ts/dag), sammenliknet med beregningene i NorFor Plan (2009). AB kyrne hadde også en svak vektøkning noe som kan tyde på at de hadde en bedre energidekning enn RB kyrne som hadde en svak vekt nedgang, men endringene i vekt var små. Beiteopptaket var moderat sammenliknet med surfôrforsøk av hvitkløver og rødkløver (Steinshamn & Thuen, 2008). Hvitkløver har i andre forsøk vist å gi et høyere fôropptak sammenliknet med rødkløver (Dewhurst et al, 2003b), noe som kan tyde på at estimeringen med beitehøydemåler gav det mest korrekte svaret. Verken beregningene i NorFor Plan (2009) eller ved bruk av beitehøydemåler gav signifikant forskjell mellom forsøksledda i beiteopptak. Dette kan forklare at melkeytelsen var tilnærmet lik i de to beitegruppene gjennom forsøksperioden, samt at forskjellen i vektendring heller ikke var signifikant. Det er sannsynlig å tro, basert på nevnte funn i andre forsøk (Dewhurst et al. 2003b), at en ville oppnådd signifikante forskjeller i fôropptak mellom beitetypene dersom det hadde vært et høyere innhold av rødkløver i RB.

4.4 Kjemisk sammensetning i melka

Innholdet av fett, protein og laktose i melk viste ingen forskjell mellom de to beitetypene, men det ble påvist en periodeeffekt i innhold av protein og urea i melka. Protein og urea steg kraftig på begge beitene gjennom forsøksperioden. I RB steg proteininnholdet fra 3,08 % i periode 1 til 3,62 % i periode 3, mens urea steg fra 2,5 - 5,3 mmol/l gjennom periodene. Proteininnholdet i AB steg fra 3,28 % i periode 1 til 3,62 i periode 3, mens urea steg fra 3,2 - 5,8 mmol/l gjennom periodene. Tallene i periode 3 er noe høyt og tyder på at PBV (protein balanse i vom) har vært for høy i den siste perioden og kyrne kan ha tapt N via urinen. Tall fra periode 1 kan tyde på underfôring av protein denne perioden for RB-kyrne. Dette gav imidlertid ikke utslag på melkeytelsen som var relativt stabil, men med en svak nedgang i periode 3 for alle kyr. Dette skyldes antagelig laktasjonsstadiet mer enn beitekvalitet og beiteinntak.

Det var et signifikant høyere innhold av α -tokoferol (vitamin E) i melken fra RB sammenliknet med melka fra AB. Dette kan skyldes det høyere nivået av α -tokoferol i rødkløvergrasbeite. Havemose et al. (2006) fant at en høy overføring av α -tokoferol til melk kunne være relatert til opptaket av flerumettede fettsyrer fra grovfôret. RB hadde en tendens til et høyere

innhold av flerumettede fettsyrer og dette kan også ha virket inn på mengden α -tokoferol i melka. Selen er også en viktig antioksidant i melk, men er ikke målt i dette forsøket. En kan likevel ikke utelukke at selen har hatt effekt.

4.5 Overføring av fettsyrer fra beite til melk

Det var forventet en høyere andel C18:3n-3 i melk fra RB både fordi det ble funnet et høyt innhold i RB og fordi en forventet at PPO som finnes i høye konsentrasjoner i rødkløver ville hemme biohydrogenering. PPO i rødkløver har en aktiv del (10 %) og en latent del (90 %) som trenger aktivering (Lee et al. 2008). For at dette skal skje kreves både ødeleggelse av cellen samt tilstedeværelse av oksygen. Dette oppnår en enkelt i produksjon av surfôr, mens når kua gresser vil rødkløveren bare i korte perioder, mens kua tygger eller drøvtygger, være utsatt for både celleødeleggelse og oksygen slik at PPO kan aktiveres (Lee et al. 2008). Lee et al. (2009) undersøkte forskjellen mellom aktivert rødkløver surfôr og ikke aktivert eller lite aktivert rødkløver (ferskt). Det ikke funnet signifikante forskjeller, men konkludert med at det trengs mer forskning om PPO sin rolle i vomma. Våre funn kan tyde på at PPO ikke ble aktivert, eventuelt ikke nok aktivert, slik at innholdet av flerumettede fettsyrer og da særlig C18:3n-3, ikke ble overført til melka i større grad. En annen medvirkende årsak kan være at dersom AB-kyrne hadde et høyere beiteopptak enn RB-kyrne, slik som estimeringen med beitehøydemåler antydte, kan dette ha ført til en utjevning mellom gruppene i innhold av flerumettede fettsyrer som C18:2n-6 og C18:3n-3 i melken.

Det ble i vårt forsøk ikke funnet noen særlig forskjell i fettsyresammensetninga i melka. Forskjellen i innhold av flerumettede fettsyrer i fôret der RB hadde den høyeste andelen gjorde at det var forventet at melk fra RB ville ha en høyere andel flerumettede fettsyrer enn det som ble funnet, selv om litteraturen viser variasjon. Steinshamn & Thuen (2008) fant at surfôr av rødkløvergras gav melk med et høyere innhold av flerumettede fettsyrer (PUFA), spesielt C18:3n-3 og et lavere n-6:n-3 forhold, enn surfôr av hvitkløver. Dewhurst et al (2003a) fant at surfôr av rødkløver sammen med kraftfôr gav et høyere innhold av C18:3n-3 sammenliknet med surfôr av hvitkløver og kraftfôr. Likevel ble det i et forsøk der en så på ferskt grovfôr (direkte høsta kløver/raigras), funnet at hvitkløver gav et høyere innhold av C18:3n-3, samt en tendens til et høyere innhold av C18:2n-6 enn melk fra rødkløver (Van Dorland et al. 2008). Det kan tenkes at biohydrogeneringen av α -linolensyre har vært større

hos RB kyrne enn hos AB kyrne. Dette kan skyldes flere ting. Dersom PPO ikke har blitt tilstrekkelig aktivert vil ikke RB kyrne få det fortrinnet en kunne forventet. En annen mulig forklaring kan være at dersom AB kyrne på grunn av hvitkløveren hadde et høyere fôropptak, en raskere passasjehastighet og en kortere oppholdstid i vomma, kan dette ha gitt dem en mindre effektiv biohydrogenering av de flerumetta fettsyrene og således et forsprang foran RB kyrne. Dette er svært usikkert da både botanisk sammensetning og fôropptak er basert på vurderinger og således kan ha mange feilkilder.

4.6 Metodiske utfordringer ved bestemmelse av oksidativ stabilitet i melk

Det ble utført et forforsøk der en testet varigheten på de kjemiske løsningene, hvordan melka oppførte seg etter opptining, og de kjemiske analysene ble prøvd ut. Uttak av melkeprøver til analyse av oksidativ stabilitet var problematisk fordi fett klumpet seg på toppen, samt at vi også fikk noe fritt fett (triglyserider som har kommet ut av melkefettkulemembranen) i enkelte prøver. Homogenisering ble forsøkt for å gjøre uttak av en representativ prøve lettere, men viste seg å være vanskelig å gjennomføre med den begrensede mengden melk som var til rådighet (ca 70-100 ml). Det hjalp heller ikke å riste prøvene fordi fett likevel ikke fordelte seg jevnt i melken og samlet seg øverst før en rakk å ta ut en prøve. Dette førte til et lite representativt fettinnhold i mange av prøvene som ble tatt ut, og kan ha virket inn på resultatet. Frysing og tining av melka var heller ikke gunstig og kan ha skadet fettdråpene. Dersom forsøket skal gjentas anbefales det enten å homogenisere melken før frysing eller utføre analysene på fersk melk. I tillegg anbefales det å pasteurisere melkeprøvene for å unngå bakterievekst.

Prøvene til peroksidanalysen ble stående i kjøleskap i påvente av analyse. Dette var uheldig og det antas at det kan ha påvirket resultatet. Peroksidene som blir dannet reagerer videre til sekundære og så tertiære oksidasjonsprodukter, en får derfor bare et øyeblikksbilde av hvor langt oksidasjonsprosessen er kommet. Det anbefales å gjøre analysen straks etter uttak fra lyskassen slik at alle prøver får lik behandling. Selv om prøvene skulle ha lik oppholdstid i kjøleskap etter belysning, og på denne måten behandles likt, er de individuelle forskjellene mellom prøvene så store, at med tanke på autooksidasjon, kan resultatet likevel bli noe misvisende. Resultater fra liknende forsøk med surfôr, der en har analysert prøvene straks etter uttak, samt brukt fersk melk, gav imidlertid samme resultat som i dette forsøket

(Adler og Veberg, 2009 – ikke publisert). Surfôrforsøket hadde også små forskjeller i botanisk sammensetning mellom forsøksfôrgruppene, noe som kan ha vært utslagsgivende for resultatet. Som metode fungerte fluorescensspektroskopi som forventet og var en rask og god måte å analysere prøvene på.

4.7 Peroksider i melk

Peroksidtesten i dette forsøket fungerte som en referanseverdi siden det er en kjent og mye brukt metode. Analysene viste ingen signifikante forskjeller mellom beitetyperne i mengde peroksider i melk. Årsaken til dette kan skyldes metodiske utfordringer som beskrevet over, samt at beitene ikke var så forskjellige i botanisk sammensetning som ønskelig slik at fettsyresammensetningen i melka ble lite påvirket. I tillegg gikk 27 av 192 prøver tapt på grunn av ulike feil under analysen, mange mulige feilkilder gjør at en ikke kan avfeie en forskjell mellom beitetyperne. Havemose et al. (2006) fant et høyere innhold av peroksider i melk fra surfôr av kløvergras (66 % hvitkløver på TS basis) sammenliknet med høy uten kløver. Dette kan forklares med et signifikant høyere innhold av C18:3n-3 i melk surfôr av kløvergras.

4.8 Fluorescens i melk

Det ble brukt to eksitasjonsbølglengder (382 nm og 410 nm) fordi vi ønsket å måle dannelsen av oksidasjonsprodukter og nedbrytning av de forskjellige fotosensitiserne i melk på samme måte som det tidligere er gjort i meieriprodukter som smør, ost og rømme (Wold et al. 2005). Vi ønsket også å undersøke om det var noen forskjell i nivået av disse fotosensitiserne i melk fra de ulike beitene ved ulik belysningstid. Det var forventet å kunne se topper for riboflavin, protoporfyrin, klorofyllderivater og tetrapyrrolforbindelser ved eksitasjon 410 nm. Analysene viste en klar nedbrytning av riboflavin ved belysning over tid, men utslagene for de andre fotosensitiserne var mye svakere enn en har sett dem i andre meieriprodukter. Dette skyldes at disse fotosensitiserne er fettløselige (Wold et al 2005). Siden det er mindre fett i melk sammenliknet med for eksempel ost og smør, vil det også være mindre av disse forbindelsene i melk. Vi hadde en teori om at ulikt beite kunne gi forskjeller i mengde fotosensitiserere, men det ble ikke funnet noen forskjell mellom beitetyperne ved de forskjellige belysningstidene.

Det var stor variasjon mellom fluorescensspektra av 0 timers prøvene. Dette kan ha flere årsaker; problemene ved uttak av en representativ prøve, biologisk variasjon ved at hver ku gir melk med noe ulik kjemisk sammensetning, samt at noe kan skyldes ulikt foropptak og selektiv beiting. Variasjonen som ses i 0 timers prøvene forplanter seg til 24 og 48 timers prøvene.

Toppene som ble målt i området 410-500 nm ved eksitasjon 382 nm viste tydelige forskjeller mellom forsøksleddene. Siden det er usikkert hva denne/disse forbindelsene er kan ikke trekke noen direkte konklusjon, men dersom det er oksidasjonsprodukter understøtter det hypotesen om at melk produsert på RB er mer utsatt for oksidasjon enn melk produsert på AB. Veberg et al. (2006c) fant oksidasjonsprodukter i samme område ved reaksjon mellom aminosyrer og aldehyder. Reaksjonen mellom aminosyrer og aldehyder er kjent for å danne fluoriserende forbindelser (Kikugawa et al. 1985)

Fluorescens fra bakterier vil også bidra til å gi fluorescens i området 410-500 nm. Det kan i noen tilfeller være en kombinasjon av oksidasjonsprodukter og fluorescens fra bakterier som ble observert i dette området. Spektra der det var sterk mistanke om at det var fluorescens fra bakterier som dominerte ble dermed regnet som outliere, og fjernet, siden de ville forstyrre analysen.

4.9 Sammenlikning av metodene

Årsaken til at det ble brukt to metoder var hovedsakelig for å se om fluorescensspektroskopi egnet seg like godt som den godt kjente peroksidtesten for å måle oksidasjon i melk. Det ble gjennomført en prinsippal component analyse (PCA) av fluorescensspektra som viste forskjeller mellom forsøksleddene i toppene der en forventet å finne oksidasjonsprodukter (PC2). Peroksidtesten viste ingen signifikant forskjell mellom forsøksleddene. Korrelasjonen mellom metodene var 0,74, noe som kan tyde på en brukbar sammenheng med bakgrunn i de metodiske utfordringene.

5.0 Konklusjon

- Rødkløvergrasbeite inneholdt en større andel flerumettede fettsyrer blant annet α -linolensyre, men det ble ikke funnet forskjeller i melka.
- RB inneholdt mer av α -tokoferol (vitamin E) enn AB noe som reflekteres i melka. Mer α -tokoferol i melka fra RB kan ses som positivt i humanernæringen.
- Det kunne ikke påvises noen forskjell i oksidativ stabilitet i melka fra de to beitetypene, selv om en i fluorescensspektroskopi fant høyere nivåer av mulige oksidasjonsprodukter i RB enn i AB.
- Det er sannsynlig at en større forskjell i botanisk sammensetning, med mer rødkløver i RB, ville gitt forskjeller i fettsyresammensetningen i melka, og da også en klarere forskjell mellom beitetypene i oksidativ stabilitet.

6.0 Referanser

(1) <http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll> (lest 10.mai 2009)

(2) <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/riboflavin.html> (lest 6.mai 2009)

Adler, S., Steinshamn, H., Purup, S., Hansen-Møller, J., Krogh Jensen, S., 2009. Effekt av driftsmåte og engalder på kvalitet av melk. I: Husdyrforsøksmøte, p. 339-334.

Adler, S., Veberg Dahl, A., Steinshamn, H., Holter Vae, A., Thuen, E., Garmo, T., Krogh Jensen, S., 2009a, Effekt av rødkløverbeite eller botanisk allsidig beite på kvalitetsegenskaper hos melk i økologisk drift. Husdyrforsøksmøte, p. 345-348.

Alfnes, T, Bævre, L. Castberg, H. B. Lukt-smaksfeil I leverandørmelk. 1987. TINE Norske meieriers landsforbund - produsenttjenesten. 9/87

Al-Mabruk, R. M. Beck, N. F. G. Dewhurst, R. J. 2004. Effects of Silage Species and Supplemental Vitamin E on the Oxidative Stability of Milk. J. Dairy Sci. Vol 87. p.406-412.

Andersen, C. M. Andersen, L. T. Hansen, A. M. Skibsted, L. H. Petersen, M. A. 2008 Wavelength dependence of light-induced lipid oxidation and naturally occurring photosensitizers in cheese. Journal of agricultural and food chemistry. Vol 56. Issue 5 p.1611-8.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959 A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol. Vol.37 p.911-917.

Børsting, C.F., Hermansen, J.E., og Weisbjerg M.R. 2003. Fedtforsyningens betydning for mælkeproduksjon. I. F.Strudsholm og K. Sejrsen (Editors). Kvægets ernæring og fysiologi. Bind 2- Fodring og produksjon. DJF- rapport Husdyrbrug nr 54, desember, 2003. S 133-152

Dewhurst, R. J. Evans, R. T. Scollan, N. D. Moorby, J. M. Merry, R. J. Wilkins, R. J. 2003b. Comparison of grass and Legume Silage for Milk Production. 2. In Vivo and In Sacco Evaluation of Rumen Function. J. Dairy Sci. Vol.86 p.2612-2621

Dewhurst, R. J. Fisher, W. J. Tweed, J. K. S. Wilkins, R. J. 2003a. Comparison of Grass and Legume Silage for Milk Production. 1. Production Responses with Different Levels of Concentrate. J. Dairy Sci. Vol.86 p.2598-2611

Dewhurst, R. J. King, P. J. 1998. Effects of extended wilting, shading and chemical additives on the fatty acids in laboratory grass silages. Grass Forage Sci. Vol.53 |p.219-224

Førtabellen. (2008) Ås, Universitetet for miljø- og biovitenskap og Mattilsynet (10.5.2009) på World Wide Web: <http://www.umb.no/iha/fortabell>

Frankel, E. N. 1988. Lipid Oxidation. The oily press LTD. Bell & Bain Ltd., Glasgow

Guilbault, G. G. 1989. Principles of fluorescence spectroscopy in the assay of food products. In: Munck L, Franciskco Ad, editors. Fluorescence analysis in foods. Copenhagen: Longman Group. p 33-58.

Hansen, E. Skibsted, LH. 2000. Light-induced oxidative changes in a model dairy spread. Wavelength dependence of quantum yields. I: Journal of agricultural and food chemistry. Vol.48, issue 8. P. 3090-3094

Harfoot, C. G., og Hazlewood, G. P. 1988. Lipid metabolism in the rumen. P.N. Hobson, and C.S. Stewart (Editors) The rumen microbial ecosystem, 2.utg.Blackie Academic & Professional, London, p. 382-426

Harstad, O. M. 1994. Fôring av mjølkekyr.

Havemose, M. S. Weisbjerg, M. R. Bredie, W. L. P. Poulsen, H. D. Nielsen, J. H. 2006. Oxidative Stability of Milk Influenced by Fatty Acids, Antioxidants, and Copper Derived from Feed. J. Dairy Sci. Vol 89. p.1970-1980

He, Y. Y. An, J. Y. Jiang, L. J. 1998 EPR and spectrophotometric studies on free radicals (O_2^\bullet , Cysa-HB \bullet) and singlet oxygen (1O_2) generated by irradiation of cysteamine substituted hypocrellin B. Int. J. Radiat. Biol. 74:647-654

Hedegard, R. V., Kristensen, D., Nielsen, J. H., Frøst, M. B., Østdal, H., Hermansen, J. E., Kro, M., ger-Ohlsen, Skibsted, L. H. 2006. Comparison of Descriptive Sensory Analysis and Chemical Analysis for Oxidative Changes in Milk. American Dairy Science Association

Hermansen, J.E., Nielsen, J.H., Larsen L.B. og Sejrsen, K. 2003. Mælkens sammensetning og kvalitet. F.Strudsholm og K. Sejrsen (Editors). Kvægets ernæring og fysiologi. Bind 2- Fodring og produksjon. DJF- rapport Husdyrbrug nr 54, desember, 2003. S 341-369

Jeness, R. Patton, S. 1959. Principles of dairy chemistry. Wiley. New York. 431p

Jones, R.M. and Hargreaves, J.N.G. 1979. Improvements to the dry-weight-rank method for measuring botanical composition. Grass and Forage Science 34, 181-89.

Jung, M. Y. Yoon, S. H. Lee, H. O. & Min, D. B. Singlet Oxygen and ascorbic acid effects on dimethyl disulfide and off-flavor in skim milk exposed to light. J. Food Sci. vol. 63 p. 408-412 (1998)

Kemp, P. & Lander, D. J. (1984). Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. J. Gen. Microbiol., Vol.130 p.527-33

Kikugawa, K. Takayanagi, K. & Watanabe, S. 1985. Polylysines modified with malonaldehyde, hydroperoxylinoleic acid and monofunctional aldehydes. Chemical & Pharmaceutical Bulletin., Vol. 33 (12), p.5437-5444.

Lee, M. R. F. Theobald, V. J. Tweed, J. K. S. Winters, A. L. Scollan, N. D. 2009. Effect of feeding fresh or conditioned red clover on milk fatty acids and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* Vol.92 p.1136-1147

Lee, M. R. F. Tweed, J. K. S. Minchin, F. R. Winters, A. L. 2008. Red clover polyphenol oxidase: Activation, activity and efficacy under grazing. *Anim. Feed. Sci. Technol.* Vol.149 p.250-264

Leiber, F. Kreuzer, M. Nigg, D. Wettstein, H. R. Scheeder, M. R. L. 2005. A Study on the Causes for the Elevated n-3 Fatty Acids in Cows` Milk of Alpine Origin. *Lipids.* Vol.40 issue 2.

Lofthus Hills, G. and Thiel C. C. 1946. The Ferric Thiocyanate Method of Estimating Peroxide in Fat of Butter, Milk and Dried Milk, *J. Dairy Res.*, Vol. 14 page 340

Lourenzo, M. Van Ranst, G. Vlaeminck, B. De Smet, S. Fievez, V. 2007a Influence of different forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk. *Animal Feed Sci. and Tech.* 11827. P.20

Lourenco, M. Smet, S. De. Raes, K. Fievez, V. 2007b. Effect of botanical composition of silages on rumen fatty acid metabolism and fatty acid composition in longissimus muscle and subcutaneous fat of lambs. *Animal.* Vol.1 issue 6. P.911-921

Mcdonald, P. Edwards, R. A. Greenhalgh, J. F. D. Morgan, C. A. 2002. *Animal Nutrition.* Ashford Colour Press Ltd., Gosport. 669p.

NorFor Plan (2009) – TINE

Østdal, H. Andersen, H. J. Nielsen, J. H. 2000. Antioxidantive Activity of Urate in Bovine Milk. *J. Agric. Food. Chem.* Vol.48 p.5588-5592

Shingfield, K. J. Griinari, M. J. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. Vol 109, issue 8, p.799-816

Skibsted, L. H. 2000. Light-Induced Changes in Dairy Products. *Bull. Int. Dairy Found.* Vol. 346 p. 4-9

Steinshamn, H. Thuen, E. 2008. White or red clover-grass silage in organic dairy milk production: Grassland productivity and milk production responses with different levels of concentrate. *Livestock science.* Vol.119 p.202-215

Van Dorland, H. A. Kreuzer, M. Leuenberger, H. Wettstein, H. R. Comparative potential of white and red clover to modify the milk fatty acid profile of cows fed ryegrass-based diets from zero-grazing and silage systems. 2008. *J Sci Food Agric.* Vol.88. p.77-85

Veberg, A. 2006. Fluorescence spectroscopy of food lipid oxidation. Doctor Scientiarum thesis 2006:12.

Veberg, A. Adler, S. 2009, 05.05.2009 (pers.com.) ikke publisert

Veberg, A. Olsen, E. Nilsen, A. N. Wold, J. P. 2006a Front Face Fluorescence Measurement of Photosensitizers and Lipid Oxidation Products during Photooxidation of Butter. A. Veberg (Editor). Fluorescence spectroscopy of food lipid oxidation, 2006.

Veberg, A. Olsen, E. Vogt, G. Mielnik, M. Nilsen, A. N. Wold, J. P. 2006b Front Face fluorescence Spectroscopy – A Rapid Method to Detect Early Lipid Oxidation in Freeze Stored Minced Turkey Meat. A. Veberg (Editor). Fluorescence spectroscopy of food lipid oxidation, 2006.

Veberg, A. Sørheim, O. Moan, J. Iani, V. Juzenas, P. Nilsen, A. N. Wold, J. P. 2006d Measurement of lipid oxidation and porphyrins in high oxygen modified atmosphere and vacuum-packed minced turkey and pork meat by fluorescence spectra and images. A. Veberg (Editor). Fluorescence spectroscopy of food lipid oxidation, 2006.

Veberg, A. Voght, G. Wold, J.P. 2006c Fluorescence in aldehyde model systems related to lipid oxidation. A. Veberg (Editor). Fluorescence spectroscopy of food lipid oxidation, 2006.

Walstra, P. Jenness, R. 1984. Dairy Chemistry and physics. John Wiley & Sons. Canada. 460p.
White, S. L. Bertrand, J. A. Wade, M. R. Washburn, J. T. Green, Jr. Jenkins, T. C. Comparison of Fatty Acid Content of Milk from Jersey and Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. 2001. J. Dairy Sci. Vol.84 p.2295-2301

Wold, J.P., Veberg, A., Lundby, F., Nilsen, A.N. 2006. Influence of storage time and color of light on photooxidation in cheese. A study based on sensory analysis and fluorescence spectroscopy. International Dairy Journal, Vol 16, Issue 10, pp 1218-1226.

Wold, J.P., Veberg, A., Nilsen, A.N., Iani, V., Juzenas, P., Moan, J. 2005. The role of naturally occurring chlorophyll and porphyrins in light-induced oxidation of dairy products. A study based on fluorescence spectroscopy and sensory analysis. International Dairy Journal, Vol 15, pp 343-353.