

Statens Planteavls-Laboratorium (Aage Henriksen)

Agrikulturkenisk afdeling (Chresten Sørensen) DK-2800 Lyngby

Om anvendelse af farvebindingsmetoden til bestemmelse af proteinindhold i græsmarksplanter

On the use of the dye binding method for determination of protein content in grassland crops

Jørgen Mortensen

Resumé

Farvebindingsmetodens anvendelighed til bestemmelse af proteinindhold i græsmarksplanter er søgt belyst ud fra en undersøgelse af forskellige faktoreres indflydelse på metoden samt ved at sammenholde farvebinding med indhold af totalkvælstof og renproteinkvælstof i prøver af græsmarksplanter.

Farvebindingen blev bestemt med et farvereagens fra firmaet N. Foss Electric, Hillerød.

Farvebindingen var afhængig af reaktionstid og -temperatur og prøvestørrelse. Opvarmning af prøvematerialet til høj temperatur eller i lang tid formindskede farvebindingen, især ved højt vandindhold i materialet.

Farvebindingen påvirkedes ikke mærkbart af Ca ved koncentrationer, som er normalt forekommende i kløver og lucerne.

Farvebindingen til en række prøver af lucerne, rød- og hvidkløver, rajgræs og kløver/græsblandinger var snævrere forbundet med prøvernes indhold af renproteinkvælstof end indhold af totalkvælstof.

Nogle afvigelser i farvebinding mellem prøver med samme indhold af renproteinkvælstof var forbundet med forskelle i indhold af basiske aminosyrer.

For prøver af rajgræs med lavt N-indhold ($< 2\%$ N) var forskelle i farvebindingen sammenfaldende med forskelle i træstofindhold. En sådan effekt kunne ikke påvises ved højere N-indhold eller for prøver af kløver og lucerne.

Farvebindingsmetoden synes anvendelig til orienterende bestemmelse af proteinindhold i græsmarksplanter.

Nøgleord: Proteinbestemmelse, farvebindingsmetode, græsmarksplanter.

Summary

The applicability of the dye binding method for determination of protein in grass and clover is evaluated from an investigation of the influence of some factors on the method and from a comparison of the dye binding capacity (DBC) of samples of grass, clover and lucerne to the content of total nitrogen and protein nitrogen.

The dye binding capacity was determined by a reagent dye solution from N. Foss Electric, Hillerød, Denmark.

The amount of dye bound was found to be influenced by reaction time, reaction temperature, and sample weight. Heating of the sample material to a high temperature or for a long period

of time decreased the dye binding capacity, especially at high water contents in the material.

The dye binding capacity was not influenced by Ca at concentrations normally found in clover and lucerne.

The dye binding capacity of samples of lucerne, red clover, white clover, ryegrass, and clover/grass-mixtures was more closely related to the content of protein nitrogen than to the content of total nitrogen.

Some differences in dye binding capacity of samples with nearly identical contents of protein nitrogen were related to the differences in contents of basic amino acids.

Differences in dye binding capacity of samples of ryegrass with low nitrogen (< 2 % N) content were correlated with content of crude fibre. This effect was not found in samples of ryegrass with higher nitrogen content, nor in samples of clover and lucerne.

The dye binding method seems to be applicable for estimation of the protein content in grassland crops.

Key-words: Protein determination, dye binding method, grassland crops.

Indledning

Proteinindholdet er sædvanligvis af stor betydning for værdien af et biologisk materiale til anvendelse i ernæringen af mennesker og dyr. Der har derfor været interesse for at kunne tage hensyn hertil ved værdiansættelsen i handel med produkter til ernæringsformål. En afregning efter proteinindhold sker allerede for mælk og i nogle tilfælde for afgrøder til grønt-tørring, og man kan tænke sig interesse for dette også på andre områder, f.eks. i kornhandel.

Disse forhold har medført en naturlig interesse for metoder til proteinbestemmelser. Det vil ofte dreje sig om relativt små partier, hvorfor der skal foretages mange analyser, hvilket igen medfører, at metoderne til proteinbestemmelser helst skal være hurtige og enkle.

Gennem mange år har proteinbestemmelserne stort set alene været baseret på en bestemmelse af kvælstofindholdet ved hjælp af Kjeldahl-metoden. Denne metode er imidlertid ret arbejdskrævende og tillige ubehagelig at arbejde med på grund af anvendelsen af koncentreret svovlsyre og natronlud og stærk opvarmning.

Man har derfor søgt at finde lettere metoder til proteinbestemmelse. En omtale af en række metoder er givet af Cole (1969), Åkerberg og Lindgren (1972) og Olered (1973).

Blandt disse metoder har farvebindingsmetoden, også kaldet DBC (»Dye Binding Capacity

ty«)-metoden, fundet nogen anvendelse til proteinbestemmelser i vegetabiliske og animalske produkter.

Ved denne metode rystes analyseprøven med en opløsning af et farvestof, som adsorberes til proteinet i prøven. Farvebindingen, d.v.s. den adsorbere eller bundne mængde farvestof, giver et udtryk for prøvens proteinindhold og kan beregnes ved at måle restkoncentrationen af farvestof i opløsningen.

Grundlaget for bindingen af farve til proteinstofferne beror på disses indhold af basiske aminosyrer, lysin, histidin og arginin. I den sure farveopløsning er disse aminosyrer positivt ladede, hvorved de kan binde de negativt ladede farvestofmolekyler. Den anvendte type farvestoffer består af såkaldte sure azo-farver, som også anvendes til farvning af proteintaver, f.eks. uld.

Farvebindingsmetoden blev oprindeligt anvendt til bestemmelse af indholdet af basiske aminosyrer i rene proteinstoffer (Fraenkel-Conrat og Cooper, 1944).

Senere blev metoden fundet anvendelig til bestemmelse af proteinindhold i hvede og hvedemel, idet Udy (1954; 1956) fandt, at farvebindingskapaciteten var konstant for en given fraktion af hvedeprotein, samt at forholdet mellem forskellige proteinfraktioner var ret ens for forskellige hvedevarieteter.

Siden er farvebindingsmetoden anvendt til

bestemmelse af proteinindhold i en lang række produkter, f.eks. forskellige kornarter (*Fajersson*, 1966; *Greenaway*, 1972; *Dahl*, 1973), lucerne og græsmarksafgrøder (*Outen et al.* 1966; *Rexen*, 1969; *Sanne*, 1974), kartofler (*Kaldy et al.* 1972), forskellige kødvarer (*Torten og Whittaker*, 1964; *Moss et al.* 1967), soyaprodukter (*Jacobsen*, 1972) og mælk (*Pedersen*, 1961; *Sherbon*, 1967).

I Danmark har firmaet N. Foss Electric, Hillerød arbejdet med teknisk udvikling af metoden under navnet Pro-Meter-metoden og har samarbejdet med Bioteknisk Institut i Kolding om forbedring af metoden (*Jacobsen*).

Farvebindingsmetoden anvendes af enkelte grønttørrerier til bestemmelse af proteinindholdet i græsmarksafgrøder. Endvidere anvendes metoden til bestemmelse af proteinindholdet i mælk, hvor dette indhold indgår i beregningsgrundlaget for betalingen til leverandørerne.

På grund af variation i indholdet af basiske aminosyrer i proteinet i de forskellige biologiske materialer findes der ikke nogen alment gældende faktor for omregning af farvebinding til indhold af protein. Det er derfor nødvendigt at bestemme sammenhængen mellem farvebinding og indhold af rå- eller renprotein bestemt ved Kjeldahl-metoden for en række prøver af det givne materiale. Det fundne sammenhæng benyttes til omregning af farvebinding til proteinindhold for de følgende prøver af det pågældende materiale.

Nærværende undersøgelse blev foretaget for at belyse farvebindingsmetodens anvendelighed til bestemmelse af proteinindhold i græsmarksafgrøder. Metodens anvendelighed må antages at bero dels på, hvor specifikt bindingen af farve sker til de basiske aminosyrer og dels på, hvor konstant indholdet af de basiske aminosyrer er i proteinet i prøvematerialet.

Undersøgelsen har omfattet en sammenligning af farvebindingen og indholdet af totalkvælstof og renproteinkvælstof i et materiale af forskellige græsmarksafgrøder. Desuden er foretaget en bestemmelse af forskellige faktorer indflydelse på farvebindingen.

Materialer og metoder

Hvor ikke andet er anført, blev der til undersøgelserne anvendt varmetørrede, formalede prøver af græsmarksplanter.

De fleste prøver var fra et kombineret slættids- og kvælstofgødskningsforsøg ved Ødum (1972), medens nogle prøver af lucerne, rødkløver og hvidkløver var fra stammeforsøg ved henholdsvis Rønhave, Ødum og Borris.

Det anvendte farvereagens blev fremstillet ud fra en standardpakning (mærket Pro-Meter II, FHI-concentrate) indkøbt fra Foss Electric, Hillerød. Pakningen indeholder dels et farvestof og dels et buffersalt, som opløses i vand, tilsættes 600 ml eddikesyre (100 %) og fortyndes til 10 l.

Farvereagenset, såkaldt FHI-væske, kan også leveres som opløsning færdig til anvendelse.

Der foreligger ikke fuld information om farvereagensets sammensætning fra firmaet, men det er oplyst, at farvestoffet er Brilliant Orange, C. I. 15970 (synonymer: Acid Orange 12, Acilanc Orange G) og, at koncentrationen heraf i opløsningen udgør 3,89 mmol pr. l. Buffersaltets sammensætning er ikke oplyst.

Ved test af farveopløsningerne fra pakning til pakning blev der fundet samme aflæsningsværdi på kolorimetret. De kolorimetrisk målinger foretoges på et Pro-Meter kolorimeter, type PMFM fra Foss Electric.

Reaktionen mellem plantemateriale og farvereagens gennemførtes i 30 ml reagensglas med skruelåg (Sovirel). Normalt blev anvendt 0,250 g stof fra grønne planter og 0,500 g stof fra kerne. Efter tilsætning af 20 ml farvereagens samt 10 stk. 8 mm glaskugler roteredes prøverne 2 timer på et Heto rotoreapparat ved 60 omdr./min. Efter henstand i ca. 30 min. filtreredes den ovenstående væske gennem et glasfiberfilter (Millipore forfilter, type AP 25).

Mængden af bundet farve til prøverne bestemtes ud fra de kolorimetrisk aflæsninger for filtraterne og en standardkurve.

Bestemmelsen af totalkvælstof (TN) og kvælstof i renprotein (PN) blev hovedsageligt foretaget som beskrevet i »Arbejdsmetoder« (1958).

Ved destillationen blev anvendt Kjeldahlud tilsat 50 ml natriumthiosulfat pr. l, og opsamlingen af ammoniak skete i 2 % borsyre tilsat 15 mg metylrødt og 30 mg bromcresolgrønt pr. l som indikator. Titreringen foretoges med 1/14 M HCl.

Resultater og diskussion

Forskellige reaktionsbetingelsers indflydelse på farvebindingen

Ifølge arbejdsforskrift fra Foss Electric gennemføres farvebindingsreaktionen enten i en såkaldt reaktor, hvor prøven og farvevæsken reagerer i et kammer med en tung, roterende stålskive i 6 min., eller i reagensglas anbragt i rotoreapparat i 60 min.

En sammenligning mellem de to metoder på forskelligt plantemateriale viste, at der fandtes en god overensstemmelse i resultaterne, som det fremgår af tabel 1.

vende 2 timers rotationstid, da små ændringer i reaktionstiden her påvirker farvebindingen så lidt, at tilstrækkelig reproducerbarhed kan opnås.

Ifølge Udy (1971) har reaktionstemperaturen en generel indflydelse på farvebindingen, medens Rexen (1969) anfører, at temperaturen var uden effekt i området 20-30° C ved måling på græsmarksprøver.

For at undersøge, om temperaturen havde en væsentlig effekt, blev der målt farvebinding ved 4 forskellige temperaturer til prøver af forskelligt plantemateriale som anført i tabel 3.

Prøverne blev holdt ved de nævnte temperaturer, indtil plantematerialet var frafiltreret, medens den kolorimetrisk måling foretoges ved samme temperatur for alle prøver.

Farvebindingen aftager med stigende temperatur, men nedgangen er procentisk lige stor for alle materialer uanset farvebindingens størrelse. Der synes at kunne regnes med samme

Tabel 1. Farvebinding til prøver af forskelligt materiale ved reaktion i stålskivereaktor (Pro-Meter) i 6 min. og i reagensglas i 60 min.

Dye bound to samples of different plant material by reaction in steel disc reactor (Pro-Meter) for 6 min., and in test tubes for 60 min.

Metode <i>Method</i>	Bygkerne	Hvedekerne	Havrekerne	Rajgræs
	<i>Barley grain</i>	<i>Wheat grain</i>	<i>Oat grain</i>	<i>Ryegrass</i>
	mg farve bundet/g prøve <i>mg dye bound/g sample:</i>			
Stålskivereaktor <i>Steel disc reactor</i>	30,4	26,6	31,4	70,0
Reagensglas <i>Test tube</i>	30,2	26,6	31,6	70,0

Tilsætning af glaskugler til prøven, som foreslået af Mossberg (1969), medførte en tydelig forøgelse i mængden af bundet farve med optimum ved 5-15 kugler pr. glas.

En undersøgelse af reaktionstidens indflydelse på farvebindingen til havrekerne tydede på, at der skete en forøgelse ud over de foreskrevne 60 min. (tabel 2). Det valgtes at an-

procentiske ændring i farvebindingen i det undersøgte temperaturområde. Gennemsnitligt udgjorde ændringen 0,36 % pr. °C.

Resultaterne er i overensstemmelse med, at en fysisk adsorption aftager med stigende temperatur. Sædvanligvis er en adsorption ved ionbinding dog ikke stærkt påvirket af temperaturen.

Tabel 2. Farvebinding til prøver af havrekerne ved forskellig reaktionstid
Dye bound to samples of oat grain at different reaction time

Reaktionstid, timer <i>Reaction time, hours</i>	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0
Farvebinding, mg/g prøve <i>Dye bound, mg/g sample</i>	30,9	31,7	32,0	32,2	32,4

Tabel 3. Reaktionstemperaturens indflydelse på farvebindingen til forskelligt plantemateriale. Farvebindingen angivet som relative tal med middelværdien for de fire temperaturer sat lig 100
Influence of the reaction temperature on the amount of dye bound to different plant material. Relative figures. The mean for the four temperatures equal to 100

Materiale <i>Material</i>	Reaktionstemperatur, °C <i>Reaction temperature</i>				Gennemsnit, mg farve bundet/g prøve
					<i>Mean, mg dye bound/g sample</i>
	10	17	26	34	
Hvedekerne <i>Wheat grain</i>	104,2	101,5	98,8	95,5	31,5 (=100)
Bygkerne <i>Barley grain</i>	103,4	101,3	99,1	96,2	35,7 (=100)
Rødkløver <i>Red clover</i>	104,4	102,4	98,9	94,3	67,5 (=100)
Rajgræs <i>Ryegrass</i>	104,2	101,6	98,7	95,4	70,7 (=100)
Gennemsnit <i>Mean</i>	104,1	101,7	98,9	95,4	
Kvotient*) <i>Quotient</i>	0,34	0,31	0,44		

*) Forholdet mellem ændring i den gennemsnitlige relative farvebinding og ændring i temperatur (Δ rel. farvebinding/ Δ °C).

The proportion between change in the mean relative amount of dye bound and the change in temperature (Δ dye bound/ Δ °C).

For at få sammenlignelige målinger må disse foretages ved en standardiseret temperatur, som anført af *Sherbon* (1967), men det skulle også være muligt at korrigere resultaterne til samme temperatur.

Der er ikke taget særlige hensyn til temperaturvariationen ved de øvrige farvebindingsmålinger i nærværende undersøgelse, som er foretaget ved almindeligt forekommende laboratorietemperatur (20-25° C). Dette vil givetvis have forøget variationen i resultaterne, men da der ikke i procedurebeskrivelsen fra *Foss Electric* foreskrives hensyntagen til temperaturen, vil variationen svare bedre til variationen, hvor denne vejledning følges.

Grundet på, at der findes en ligevægt mellem bundet og ikke-bundet farve, vil farvebindingens størrelse afhænge af koncentrationen af farvestof i opløsningen (*Udy*, 1971) og tillige af prøvestørrelsen, som fundet af *Outen et al.* (1966). Dette bekræftedes af et forsøg med forskellige mængder af hvedekerne og rajgræs, som viste, at farvebindingen pr. vægtenhed af prøven aftog, når mængden af prøve forøgedes.

For at få sammenlignelige resultater er det derfor nødvendigt, at prøvestørrelsen er standardiseret.

Det omtalte forhold medfører også, at farvebindingen beregnet pr. vægtenhed af protein aftager med stigende koncentration af protein i prøven, selv ved konstant prøvestørrelse.

Farvebinding til prøver udsat for forskellig varmebehandling

Opvarmning af biologisk materiale kan medføre forskellige reaktioner, hvorved de frie aminogrupper i de basiske aminosyrer blokeres. Herved må forventes en nedgang i farvebindingen til materialet, som det også er fundet i flere forsøg. Ved tørring af bygkerne ved 100° C i 16 timer fandt *Mossberg* (1965) en nedsat farvebinding, ligesom høj tørringstemperatur (130° C) mindskede farvebindingen til soyabønner (*Hymowitz et al.*, 1969).

Da der muligvis kunne forekomme vekselvirkning mellem temperatur og tid med hensyn til opvarmningsindflydelse på farvebindingen, blev der foretaget et forsøg med kombination af disse faktorer.

Formalede prøver af frysetørret rajgræs og lufttør bygkerne blev anbragt i tørreskab ved forskellige temperaturer og i forskellige tidsrum, hvorefter der bestemtes farvebinding til prøverne. Forsøgsbehandlingen og resultaterne

Tabel 4. Farvebinding til formalede prøver af frysetørret rajgræs og luft-tørret bygkerne varmebehandlet ved varieret temperatur og tid
Dye bound to ground samples of freeze dried ryegrass and air dried barley grain heated at different temperature and time.

Materiale <i>Material</i>	Temperatur, °C <i>Temperature</i>	Opvarmningstid, timer <i>Heating time, hours</i>		
		2	6	18
		mg farve bundet/g prøve: <i>mg dye bound/g sample:</i>		
	Uden opvarmning <i>Without heating</i>	———— (79,4) ————		
Rajgræs <i>Ryegrass</i>	80	79,6	79,6	79,2
	100	78,2	77,6	75,8
	130	72,4	69,4	—
	Uden opvarmning <i>Without heating</i>	———— (39,3) ————		
Bygkerne <i>Barley grain</i>	80	39,4	39,2	39,3
	100	38,7	38,5	37,8
	130	37,5	35,4	—

fremgår af tabel 4. Opvarmningen ved 80°C påvirkede ikke farvebindingen inden for de anvendte tidsrum for nogen af materialerne, medens 100°C medførte et fald i farvebindingen allerede i løbet af 2 timer og yderligere fald med tiden. Ved 130°C var påvirkningen endnu stærkere, f.eks. ses, at 2 timer ved denne temperatur havde større effekt end 18 timer ved 100°C.

Da det kunne forventes, at effekten af varmebehandlingen var afhængig af vandindholdet i materialet, blev der foretaget en mindre undersøgelse til belysning af dette forhold.

Hel, frysetørret rajgræs blev klippet i småstykker og blandet og fordelt i prøver á 5 g. Til nogle af prøverne sattes 25 ml vand, hvor- efter de henstod 15 min. inden gentørring, enten ved frysetørring eller ved varmetørring

Tabel 5. Farvebinding til prøver af frysetørret rajgræs med og uden genfugtning og gentørring ved forskellig temperatur
Dye binding capacity of samples of freeze dried ryegrass with and without re-wetting of the sample and drying again at different temperature

Vandtilsætning, ml/5 g prøve <i>Water addition, ml/5 g sample</i>	% tørstof <i>% DM</i>	Frysetørret <i>Freeze dried</i>	Ovntørret, °C <i>Dried in oven</i>		
			80	100	120
			mg farve bundet/mg N: <i>mg dye bound/mg N:</i>		
0	95	—	2,39	2,40	2,27
25	16*)	2,40	2,16	2,18	2,10

*) beregnet (*calculated*)

ved forskellig temperatur i varmeskab med mekanisk ventilation. Prøverne varmebehandles i 2 timer, hvilket var tilstrækkeligt til tørring af prøverne ved de anvendte temperaturer. For at undgå variation mellem de opdeltte prøver forårsaget af forskellig kvælstofkoncentration blev farvebindingen beregnet med prøvernes kvælstofindhold som basis. Forsøgsbetinger og resultater fremgår af tabel 5.

I overensstemmelse med resultaterne i tabel 4 havde opvarmningen ved 80 og 100°C ingen effekt på farvebindingen til det tørre materiale, medens der findes en nedgang ved 120°C.

Derimod var der en tydelig nedgang i farve-

Da nitrat-ionerne er negativt ladede ligesom farvestof-ionerne, vil der ikke kunne ske nogen ionbinding mellem disse. Derimod vil frie aminosyrer i sur væske være positivt ladede med een eller to (basiske aminosyrer) ladninger pr. molekyle. Såfremt aminosyrerne dannede tungtopløselige forbindelser med farvestoffet, ville effekten kunne blive meget stor, hvis der skete fældning i ækvivalente forhold.

For at undersøge, om der fandtes en effekt af frie aminosyrer, måltet farvebinding til 0,25 g's prøver af rajgræs og rødkløver tilsat 5 mg af forskellige aminosyrer. Arten af aminosyrer og den målte farvebinding fremgår af tabel 6.

Tabel 6. Farvebinding til prøver af rajgræs og rødkløver (0,25 g) tilsat 5 mg af forskellige aminosyrer
Dye bound to samples of ryegrass and red clover (0,25 g) with 5 mg of different amino acids added

Aminosyretilsætning <i>Amino acid added</i>	μmol farve bundet/prøve μmol dye bound/sample	
	Rajgræs <i>Ryegrass</i>	Rødkløver <i>Red clover</i>
Ingen <i>None</i>	48,8	46,2
Lysin <i>Lysine</i>	49,2	46,4
Histidin <i>Histidine</i>	49,3	46,9
Arginin <i>Arginine</i>	49,8	47,1
Leucin <i>Leucine</i>	49,2	46,2
Tyrosin <i>Tyrosine</i>	49,2	46,2
Glutaminsyre <i>Glutamic acid</i>	49,2	46,2

bindingen til de fugtede og varmetørrede prøver, uanset tørringstemperaturen.

Ved sammenligning af Kjeldahl-metoden og farvebindingsmetoden, som skal omtales senere, anvendtes varmetørrede prøver, hvorfor den fundne farvebinding må antages at være påvirket heraf. I bedste fald har påvirkningen været den samme for alle prøver, således at der kun har været en niveauændring i farvebindingen, medens variationen mellem prøverne ikke er øget.

Effekt af frie aminosyrer på farvebindingen
Lavmolekylære kvælstofforbindelser anses for at være uden virkning på farvebindingen.

Tilsyneladende fandtes der en svag forøgelse i farvebindingen for begge materialer ved tilsætningen af de basiske aminosyrer og tydeligst for arginin. Forøgelsen i farvebindingen for arginin var imidlertid kun omkring 1 μmol , medens tilsætningen udgjorde ca. 29 μmol . Effekten af frie aminosyrer må derfor betegnes som lille og uden betydning for resultaterne.

Da en tilsvarende mængde af arginin uden tilsætning af prøvemateriale ikke gav bundfældning af farvestoffet, må den tilsyneladende effekt formentlig skyldes, at såvel aminosyre som farvestof adsorberes til prøvematerialet.

Indflydelse af Ca på farvebindingen

Det har været anført, at Ca kan influere på farvebindingen (Rexen og Israelsen, 1970). Imidlertid er indflydelsen af Ca hævdet at være stærkt reduceret ved anvendelse af den såkaldte FHI-væske (Foss Electric, 1972), uden at det er oplyst, hvorledes dette er opnået. Tilsætning af oxalsyre til farvereagenset er nævnt at kunne svække indflydelsen af Ca (Åkerberg og Lindgren, 1972).

Såfremt der findes en effekt af Ca, vil et varierende Ca-indhold i græsmarksprøverne kunne medvirke til variation i farvebindingen til prøverne.

For at undersøge i hvor høj grad Ca kunne påvirke farvebindingen, blev der gennemført et forsøg med måling af farvebinding til prøver af lucerne og rødkløver med henholdsvis 1,40 og 1,29 % Ca (Witt). Til prøverne blev sat stigende mængder Ca i form af CaCl_2 . Ud fra det oprindelige Ca-indhold og de tilsatte Ca-mængder er beregnet et Ca-indhold for hver prøve. Resultaterne og de tilsatte Ca-mængder og -indhold fremgår af tabel 7.

Der synes at være en lineær stigning i farvebindingen med stigende Ca-tilsætning. Det er dog langt fra en ækvivalent forøgelse, idet tilsætning af 250 μmol Ca kun har forøget farve-

bindingen med omkring 2 μmol . Denne Ca-tilsætning gav et Ca-indhold betydeligt over, hvad der normalt forekommer i græsmarksplanter. I prøverne fra Ødum Forsøgsstation blev maksimalt fundet 2,13 % Ca i rødkløver og 2,14 % Ca i lucerne. Dette svarer omtrent til mængden i prøverne efter den første Ca-tilsætning, hvor der næppe kan spores nogen indflydelse på farvebindingen.

Almindeligvis forekommer der ikke over 2 % Ca i græsmarksplanternes tørstof (Henriksen, 1965). Indhold på op mod 3 % er fundet i lucerne (Kivimäe, 1959), men heller ikke denne størrelse vil influere stærkt på farvebindingen ifølge nærværende undersøgelse.

Farvebinding til prøver af græsmarksplanter i relation til indhold af totalkvælstof og protein-kvælstof

Normalt danner kvælstofbestemmelser grundlag for beregning af proteinindhold.

Der blev derfor foretaget en undersøgelse af relationen mellem farvebinding og indhold af totalkvælstof (TN) og kvælstof i renprotein (PN) til belysning af farvebindingsmetodens egnethed til proteinbestemmelse i forskellige græsmarksplanter.

Tabel 7. Farvebinding til lucerneprøver og rødkløverprøver tilsat stigende mængder calcium. Prøver á 0,25 g plantemateriale + Ca-tilsætning reageret med 20 ml farveopløsning i 2 timer

Dye bound to samples of ryegrass and red clover with different amounts of Ca added. Samples of 0,25 g plant material + Ca-addition reacted with 20 ml dye solution for 2 hours

Ca-tilsætning Ca added		Lucerne Lucerne		Rødkløver Red clover	
mg Ca/ prøve mg Ca/ sample	μmol Ca/ prøve μmol Ca/ sample	% Ca i prøve % Ca in sample	Farvebinding, μmol /prøve Dye bound, μmol /sample	% Ca i prøve % Ca in sample	Farvebinding, μmol /prøve Dye bound, μmol /sample
0	0	1,40	33,8	1,29	47,1
2	50	2,20	33,8	2,09	47,4
4	100	3,00	34,4	2,89	47,8
6	150	3,80	34,8	3,69	48,3
8	200	4,60	35,6	4,49	48,8
10	250	5,40	35,8	5,29	49,4

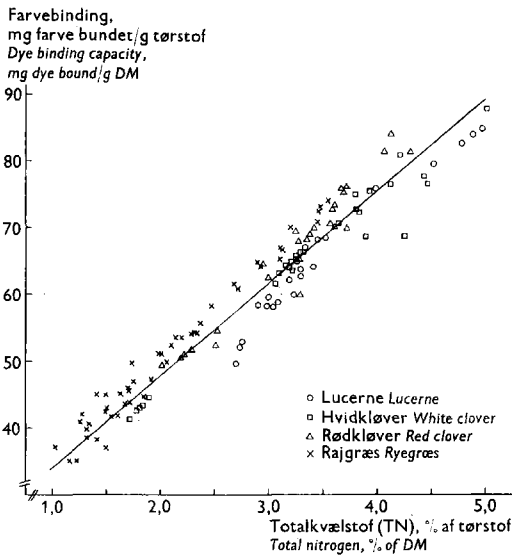


Fig. 1. Relation mellem farvebinding og indhold af totalkvælstof i prøver af lucerne, rødkløver, hvidkløver og rajgræs.

Relation between dye binding capacity and content of total nitrogen in samples of lucerne, red clover, white clover and ryegrass.

I fig. 1 og 2 er vist relationen mellem farvebinding og indhold af henholdsvis TN og PN. På figurerne er indtegnet regressionslinier for de afbildede punkter. Desuden blev der foretaget beregninger af retliniede regressioner for de enkelte afgrødetyper. Regressionsligningerne samt spredning i TN og PN omkring regressionslinierne og korrelationskoefficienterne er vist i tabel 8. Her er også anført værdier for materiale af kløver/græs-blandinger, som for overskuelighedens skyld ikke er taget med på figurerne.

Sammenlignes relationerne mellem farvebindingen og henholdsvis PN og TN, ses af tabellen og figurerne, at spredningen, med lucerne som undtagelse, var mindre for PN end for TN. I samklang hermed var korrelationskoefficienterne større for PN end for TN, med lucerne og rajgræs som undtagelse. At farvebindingen generelt er snævrere forbundet med PN

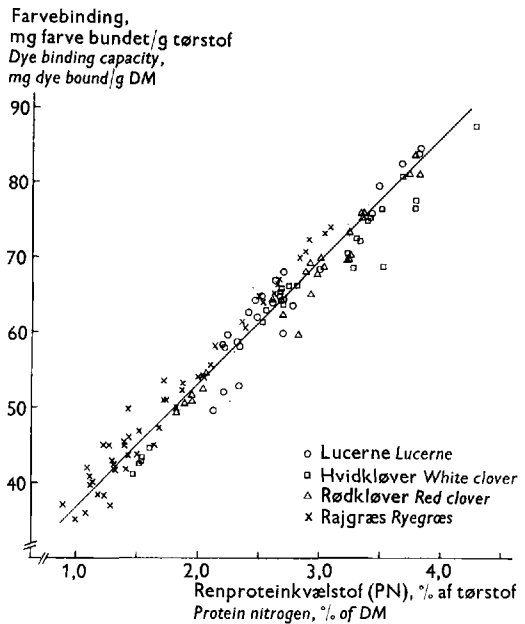


Fig. 2. Relation mellem farvebinding og indhold af renprotein kvælstof i prøver af lucerne, rødkløver, hvidkløver og rajgræs.

Relation between dye binding capacity and content of protein nitrogen in samples of lucerne, red clover, white clover and ryegrass.

end med TN, må tilskrives det forhold, at TN omfatter lavmolekylære letopløselige kvælstof-forbindelser, f.eks. nitrat og frie aminosyrer, der ikke indgår i PN og heller ikke påvirker farvebindingen.

Af tabel 8 ses, at med rødkløver som undtagelse var hældningen, d.v.s. kvotienten til farvebindingen (F), mindre for PN end for TN, hvilket hænger sammen med en mindre variationsbredde i PN end i TN.

Sædvanligvis findes der ikke særlig forskel på relationen mellem farvebinding og råproteinindhold for lucerne- og græsmarksprøver (Rexen, 1969; Sanne, 1974), og der anvendes normalt samme omregningsgrundlag for sådanne prøver. En statistisk test viste imidlertid, at der fandtes signifikante ($P = 95\%$) forskelle på nogle af regressionsligningerne for de forskellige afgrødetyper.

Testen omfattede både ligningernes hældning

Tabel 8. Regressions- og korrelationsberegninger for sammenhængen mellem farvebinding ($F = \text{mg farve bundet/g tørstof}$) og indhold af totalkvælstof ($TN = \% \text{ totalkvælstof i tørstof}$) og renproteinkvælstof ($PN = \% \text{ renproteinkvælstof i tørstof}$) i prøver af græsmarksplanter

Regression and correlation computations for the relation between dye binding capacity ($F = \text{mg dye bound/g DM}$) and the content of total nitrogen ($TN = \% \text{ total nitrogen in DM}$) and protein nitrogen ($PN = \% \text{ protein nitrogen in DM}$) in samples of grassland plants

Afgrødetype (antal prøver) <i>Crop</i> (number of samples)	Regressionsligning <i>Regression equation</i>	s (Spredning, % N) (Standard deviation, % N)	r (Korrelations- koefficient) (Correlation coefficient)
Lucerne (23) <i>Lucerne</i>	TN = $0,067 \times F \div 0,90$ PN = $0,053 \times F \div 0,69$	0,15 0,16	0,975 0,958
Hvidkløver (27) <i>White clover</i>	TN = $0,070 \times F \div 1,23$ PN = $0,061 \times F \div 1,17$	0,19 0,16	0,977 0,980
Rødkløver (26) <i>Red clover</i>	TN = $0,059 \times F \div 0,73$ PN = $0,059 \times F \div 1,02$	0,16 0,11	0,971 0,983
Rajgræs (48) <i>Ryegrass</i>	TN = $0,064 \times F \div 1,17$ PN = $0,054 \times F \div 0,99$	0,12 0,11	0,987 0,984
Hvidkløver/rajgræs (60) <i>White clover/ryegrass</i>	TN = $0,064 \times F \div 1,00$ PN = $0,058 \times F \div 1,12$	0,11 0,10	0,976 0,978
Rødkløver/rajgræs (60) <i>Red clover/ryegrass</i>	TN = $0,062 \times F \div 0,85$ PN = $0,061 \times F \div 1,26$	0,11 0,09	0,977 0,985
Total (244)	TN = $0,069 \times F \div 1,30$ PN = $0,061 \times F \div 1,23$	0,18 0,13	0,972 0,980

og deres niveau. Som niveau blev anvendt det beregnede indhold af PN eller TN ved den gennemsnitlige farvebindingsværdi for samtlige prøver.

Testen viste, at for afgrødetyperne rødkløver, hvidkløver/rajgræs-blanding og rødkløver/rajgræs-blanding kunne TN/farvebindingsrelationerne beskrives med samme ligning ($P = 95\%$). For PN/farvebindingsrelationerne fandtes tilsvarende ingen forskelle mellem ligningerne for lucerne, rødkløver og hvidkløver.

Størst forskel synes der at være mellem rajgræs og lucerne for TN/farvebindingsrela-

tionerne, som det fremgår af fig. 1. Denne forskel var mindre for PN/farvebindingsrelationerne (fig. 2) i overensstemmelse med, at PN gennemsnitligt og generelt udgjorde en større procentdel af TN i rajgræs end i lucerne.

Da farvebindingen primært er bestemt af indholdet af basiske aminosyrer, vil overensstemmelsen mellem regressionsligningerne for de forskellige afgrøder afhænge af overensstemmelsen i indholdet af basiske aminosyrer i proteinstofferne i disse afgrøder.

Opgivne værdier i litteraturen (Steen, 1969; Nehring *et al.*, 1970) viser et lidt højere ind-

hold af basiske aminosyrer i kvælstoffraktionen i græs end i kløver. Sammenligningen vanskeliggøres imidlertid af, at indholdet ændres med planternes alder og med koncentrationen af kvælstof i planterne.

Et statistisk mål for den gennemsnitlige forskel mellem de to metoder haves i spredningen (s) anført i tabel 8. Denne er af samme størrelse som fundet for tilsvarende materiale i andre undersøgelser (Outen *et al.* 1966; Rexen, 1969; Sanne, 1974).

Hvor store afvigelser der kan forekomme i enkeltprøver mellem farvebindingsmetoden og Kjeldahl-metoden med hensyn til procentisk indhold af TN eller PN, kan ses af fig. 1 og 2,

idet afvigelserne udgøres af den vandrette afstand mellem punkterne og regressionslinien.

Farvebinding i relation til indhold af basiske aminosyrer

Selv om farvebindingen som vist var snævrere forbundet med indholdet af PN end af TN, fandtes der også i relation til PN kendelige forskelle i farvebindingen til prøver af samme type plantemateriale.

For at undersøge om disse forskelle kunne skyldes forskelle i koncentrationen af basiske aminosyrer, blev nogle få prøver analyseret for aminosyreindhold. Prøverne udvalgte, så de parvis var af samme materiale og havde om-

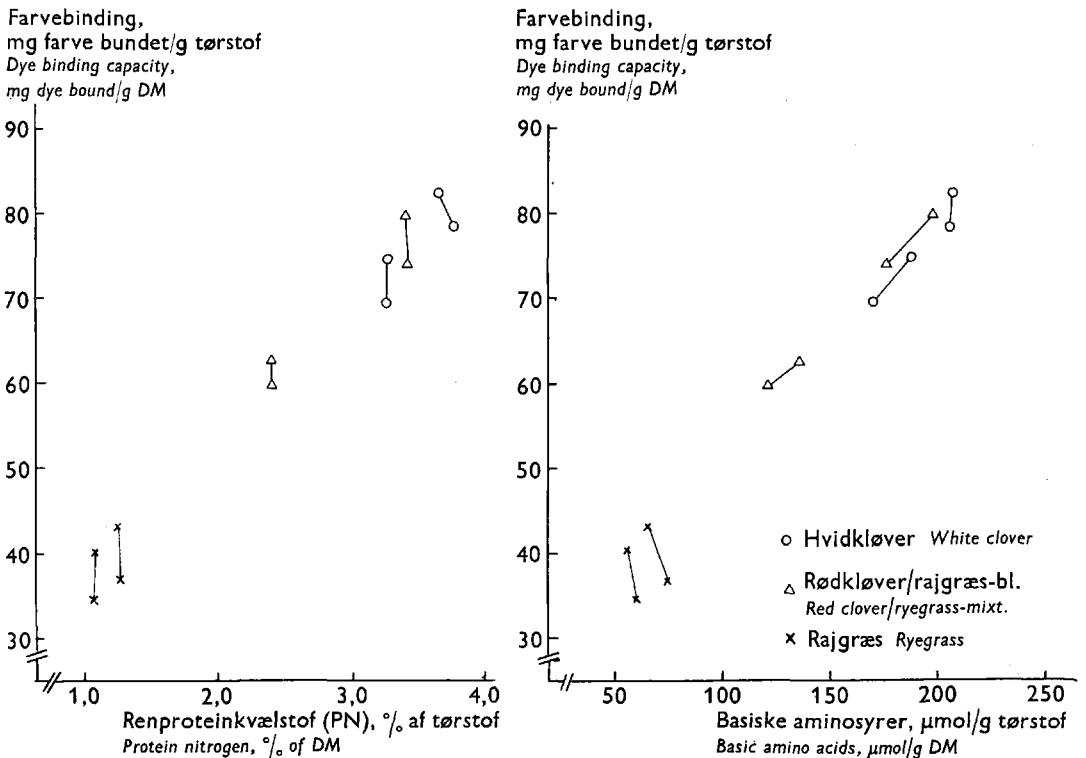


Fig. 3. Farvebinding i relation til indhold af renproteinkvælstof (A) og indhold af basiske aminosyrer (B) i forskellige græsmarksprøver. Prøver med omtrent samme indhold af renproteinkvælstof er forbundet parvis i både (A) og (B).

Dye binding capacity in relation to the content of protein nitrogen (A) and the content of basic amino acids (B) in some samples of grassland crops. Samples with nearly identical contents of protein nitrogen are connected in pairs on both (A) and (B).

trent samme indhold af renprotein, men udviste tydelige forskelle i farvebinding.

I fig. 3 er vist dels relationen mellem farvebinding og indhold af PN (A) og dels mellem farvebinding og indhold af basiske aminosyrer (B). Prøverne med omtrent samme indhold af renprotein er forbundet parvis i begge delfigurer.

Sammenlignes delfigurerne (A) og (B), ses det, at for prøverne af hvidkløver og rødkløver/rajræs-blanding er den af par-prøverne med den højeste farvebinding placeret længere mod højre i (B) end i (A) i forhold til den anden par-prøve. Dette betyder, at par-prøven med den højeste farvebinding havde et relativt større indhold af basiske aminosyrer end den anden par-prøve.

Den samme ændring i placering fra (A) til (B) fandtes derimod ikke for rajgræsprøverne, hvor bevægelsen snarere gik lidt modsat. Forskellen i farvebinding mellem de parvise prøver af rajgræs kunne således ikke forklares ved forskelle i koncentrationen af basiske aminosyrer, men må have sin årsag i andre forhold.

Farvebinding i relation til træstofindhold i rajgræsprøver

For de ovenfor omtalte rajgræsprøver viste det sig, at prøverne med den højeste farvebinding havde et tydeligt større træstofindhold end prøverne med lav farvebinding, henholdsvis ca. 18 og 22 mod 28 og 29 % træstof.

Til nærmere belysning af træstofindholdets eventuelle indflydelse på farvebindingen blev der foretaget en opdeling af resultaterne fra alle rajgræsprøverne i 4 grupper efter træstofindholdet, som er oplyst fra Ødum, (Witt).

Resultatet af opdelingen ses af fig. 4. Det ses, at ved lavt indhold af PN øges farvebindingen tydeligt med øget træstofindhold, medens der ikke synes at være nogen »træstoeffekt« ved højere indhold af PN.

Ved opdeling af det øvrige materiale (lucerne-, kløver- og blandingsprøver) fandtes ingen effekt af træstof.

Den påviste effekt af træstofindholdet kunne skyldes en hertil korreleret variation i indholdet

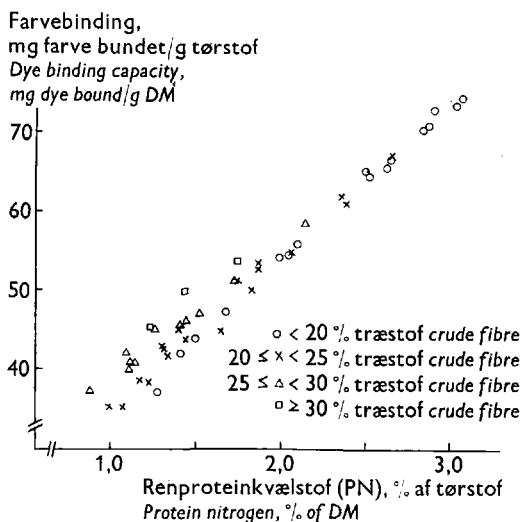


Fig. 4. Relation mellem farvebinding og indhold af renproteinkvælstof i rajgræs ved forskelligt træstofindhold.

Relation between dye binding capacity and content of protein nitrogen in samples of ryegrass at different contents of crude fibre.

af basiske aminosyrer, men at dette ikke synes at være tilfældet, fremgår af de målte indhold af basiske aminosyrer i de forannævnte 4 rajgræsprøver.

Når der ikke kunne påvises effekt af træstofindholdet ved højere proteinindhold, kan det skyldes, at en opdeling efter træstofindhold samtidig medfører en opdeling efter indhold af PN, da disse egenskaber sædvanligvis er stærkt negativt korrelerede.

Konklusion

Farvebindingsmetoden synes at være en hurtig og billig metode til bestemmelse af proteinindhold i græsmarksplanter.

Proteinindholdet i græsmarksplanter bestemt efter farvebindingsmetoden kan afvige en del fra råproteinindholdet bestemt efter Kjeldahlmetoden, hvilket bl.a. skyldes, at sidstnævnte metode omfatter lavmolekylære N-forbindelser, som ikke påvirker farvebindingen. Desuden findes der afvigelser som følge af variation i proteinets indhold af basiske aminosyrer, lysin,

histidin og arginin, der er det egentlige grundlag for farvebindingen.

Det må anses for en fordel ved farvebindingsmetoden, at den ikke medtager nitrat, som er uden værdi i fodringen, medens det må anses for en ulempe, at metoden ikke medtager andre lavmolekylære N-forbindelser, f.eks. frie aminosyrer, som normalt kan udnyttes af dyrene.

Materiale med relativt højt indhold af basiske aminosyrer i proteinet vil få tillagt et relativt højere proteinindhold efter farvebindingsmetoden, hvilket næppe er rimeligt, hvor materialet anvendes til drøvtyggere, da aminosyresammensætningen i foderet normalt ikke anses at have betydning for disse.

Det må tillige anses for en ulempe ved metoden, at farvebindingen synes at øges med øget træstofindhold, men denne effekt kunne dog kun påvises ved lavt proteinindhold i rajgræs.

Farvebindingen påvirkes af reaktionsomstændighederne, f.eks. tid og temperatur og af prøvemængde, hvorfor metoden må være standardiseret for at give sammenlignelige resultater fra gang til gang og fra sted til sted. Det vil være en fordel at anvende et standardiseret farvereagens, som der er anvendt i denne undersøgelse (se »Materialer og metoder«), men det er en mangel, at reagensets sammensætning ikke er fuldt oplyst.

En yderligere bedømmelse af farvebindingsmetodens anvendelighed vil kræve sammenligning af målinger fra forskellige steder. Desuden ville det være af interesse, om resultaterne fra denne metode og fra Kjeldahl-metoden blev bedømt i relation til resultaterne fra kvalitetsbedømmelser ved fodringsforsøg ved analysering af foreliggende materiale fra sådanne forsøg.

Litteraturliste

»Arbejdsmetoder« (1958). I Del: Kemiske undersøgelser af mælk og mejeriprodukter m.m. samt foderstoffer.

Cole, E. R. (1969). Alternative methods to the Kjeldahl estimation of protein nitrogen. *Rev. Pure and Appl. Chem.* 19, 109-130.

Dahl, B. (1973). Undersøgelser over lagertilstanden i dansk-avlet foderkorn. Beretning nr. 64. Forskningsinstituttet for Handels- og Industriplanter.

Fajersson, F. (1966). Vergleichende Untersuchungen mit dem Prometer und der Kjeldahl-Metode mit Rücksicht auf Sorten-, Düngungs- und Jahrgangsunterschiede. *Getreide und Mehl* 16, 2-5.

Foss Electric (1972). Measuring of protein in alfalfa (lucerne and grasspills) with Pro-Meter MK II. Application Notes nr 7, 1-5.

– (1973). Pro-Meter MK II. Technical Notes no 3 (D), 1-10.

Fraenkel-Conrat, H. & Cooper, M. (1944). The use of dyes for the determination of acid and basic groups in proteins. *J. Biol. Chem.* 154, 239-246.

Greenaway, W. T. (1972). Comparison of the Kjeldahl, dye-binding, and biuret methods for wheat protein content. *Cereal Chem.* 49, 609-615.

Henriksen, Aa. (1965). Om afgrødernes mineralstofindhold. *Tidsskr. f. Planteavl* 68, 784-804.

Hymowitz, T.; Collins, F. I. & Gibbons, S. J. (1969). A modified dye-binding method for estimating soybean protein. *Agron. Journ.* 61, 601-603.

Jacobsen, E. E. (1972). Farvebindingsmetoden (DBC, Pro-Meter) anvendt til soyaprodukter. Meddelelser fra Korn- og foderstoflaboratoriet, Forskningsinstituttet for Handels- og Industriplanter 5. årgang, nr. 4.
– (personlig meddelelse).

Kaldy, M. S.; Malewski, W. & Markakis, P. (1972). Estimation of potato protein content by dye binding. *Amer. Potato Journ.* 49, 177-181.

Kivimäe, A. (1959). Chemical composition and digestibility of some grassland crops. *Acta Agric. Scand. Suppl.* 5, 1-142.

Moss, V. G. & Kielsmeier, E. W. (1967). A method for rapid determination of protein in meat by dye binding. *Food Technology* 21, 33A-36A.

Mossberg, R. (1965). Some problems concerning the determination of crude protein content in cereals by dye binding. *Agri. Hort. Gen.* 23, 206-218.

– (1969). Evaluation of protein quality and quantity by dye-binding capacity: A tool in plant breeding. In: *New Approaches to Breeding for Improved Plant Protein*, 151-160. Proc. Panel, Röstanga. – International Atomic Energy Agency, Vienna 1969.

- Nehring, K.; Beyer, M. & Hoffmann, B.* (1970). Futtermitteltabellenwerk. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin. pp 460.
- Olered, R.* (1973). Några olika metoder att bestämma proteinhalt i cerealier. Sveriges Udsädesforenings Tidskrift 83, 299-312.
- Outen, G. E.; Tilley, J. M. A. & Wilson, R. F.* (1966). Estimation of protein in dried herbages using the dye-stuff Orange G. J. Sci. Fd. Agric. 17, 285-286.
- Pedersen, Aa. H.* (1961). Undersøgelser over metoder til bestemmelse af besætningsmælks sammensætning specielt med henblik på proteinindholdet. Beretning fra Statens Forsøgsmejeri nr. 130, 1-109.
- Rexen, B.* (1969). Proteinbestemmelse i tørrede grønafgrøder med Pro-Meter. Meddelelser fra Grønmelslaboratoriet, Forskningsinstituttet for Handels- og Industriplanter 10. årgang, nr. 3, 137-147.
- Rexen, B. & Israelsen, M.* (1970). Pro-Meter-protein contra Kjeldahl-protein. Meddelelser fra Grønmelsafdelingen, Forskningsinstituttet for Handels- og Industriplanter 11. årgang, nr. 4, 195-204.
- Sanne, S.* (1974). Bestämning av vallfoders proteinhalt med färgbindningsmetod. Konsulentavdelings Stencilserie Husdjur 44, K1-K14. Landbrukshögskolan, Uppsala.
- Sherbon, J. W.* (1967). Rapid determination of protein in milk by dye binding. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50, 542-547.
- Steen, E.* (1969). Aminosyror i vallväxter. Svensk valltidskrift 8, 188-190.
- Torten, J. & Whitaker, J. R.* (1964). Evaluation of the biuret and dye-binding methods for protein determination in meats. J. Food Sci. 29, 168-174.
- Udy, D. C.* (1954). Dye-binding capacities of wheat flour protein fractions. Cereal Chem. 31, 389-395.
- (1956). Estimation of protein in wheat and flour by ion-binding. Cereal Chem. 33, 190-197.
- (1971). Improved dye method for estimating protein. J. Am. Oil Chemists' Soc. 48, 29A-33A.
- Witt, N.* (personlig meddelelse).
- Akerberg, E. & Lindgren, D.* (1972). Näringsproteinanalys. Behov och metoder. Rapport (98 sidor). Lantbrukshögskolan, Uppsala.

Manuskript modtaget den 1. oktober 1975