



# Statens Husdyrbrugsforsøg 1986

## Meddelelse

6. MARTS

NR. 609

### Individuelle aromatiske cholinestere og deres bidrag til tannin- kvalitets- og ernæringsmæssige problemer ved rapsfrøprodukter

Svend Clausen<sup>1</sup>, Bjørn O. Eggum<sup>2</sup>, Ingeborg Jacobsen<sup>2</sup>, Lone Melchior Larsen<sup>1</sup>, Annette Pløger<sup>1</sup> og Hilmer Sørensen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kemisk Institut, Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole

<sup>2</sup>Afdelingen for dyrefysiologi og biokemi, Statens Husdyrbrugsforsøg

Den foreliggende forsøgsserie tog sigte på afklaring af aromatiske cholinesters bidrag til tannin, samt kvalitets- og ernæringsmæssige problemer ved anvendelse af rapsfrøprodukter som fodermiddel. Forsøgene har omfattet fire udvalgte aromatiske cholinestere: sinapin, p-coumaroylcholin, p-hydroxybenzoylcholin og hesperalin. Effekten af stofferne blev undersøgt ved anvendelse af forskellige koncentrationer (0.5, 4, 8 og 16  $\mu\text{mol/g}$  diæt) af de enkelte cholinestere iblandet en standard diæt, som blev givet til rotter i balanceforsøg. Som kriterier blev benyttet proteinudnyttelse, fordøjelig energi, tilvækst, vægt af lever og nyrer samt stoffernes omdannelse/absorption fra mave-tarmsystemet.

Resultaterne viste, at de aromatiske cholinestere gav et væsentligt bidrag til det tanninrespons, der er karakteristisk for rapsfrøprodukter. Sinapin, der normalt ophobes til betydelige koncentrationer i rapsfrø, samt de andre undersøgte aromatiske cholinestere, gav, ved de anvendte koncentrationer af stofferne i foderet, kun en ubetydelig eller ingen effekt på dyrenes tilvækst, energi- og proteinudnyttelse. Der fandtes i nogle tilfælde en tendens til dosisrelateret, men mindre effekt af de phenoliske forbindelser på vægten af lever og nyrer. Hovedparten af de aromatiske cholinestere blev absorberet i den første halvdel af tyndtarmen, og for den del, der nåede blind- og tyktarm, skete der en betydelig hydrolyse og dermed dannelse af de tilsvarende carboxylsyrer. Det konkluderes fra de opnåede resultater, at sinapin i rapsfrø ikke har nogen nævneværdig effekt på den ernæringsmæssige værdi af rapsfrø, selv om der er et væsentligt tanninbidrag fra sinapin. Derimod er der god grund til at være opmærksom på den effekt, aromatiske cholinestere, specielt sinapin og produkter deraf, kan have på kvaliteten af rapsprodukter (afsmagsproblemer), idet undersøgelsen viser, at disse stoffer kan absorberes.

#### Indledning

Dobbeltlave rapssorter med et lavt indhold og gunstig indbyrdes fordeling af de enkelte glucosi-

nolater er en lovende olie- og proteinkilde. Yderligere forbedring af de dobbeltlave sorter synes imidlertid at være muligt, såfremt man kan sænke

indholdet af tannin og fibre. Specielt de enmavede dyr som grise, fjerkræ og mink vil være følsomme overfor disse stoffer, hvad angår protein- og energiudnyttelsen. Afklaring af årsagerne til de i nogle tilfælde rapporterede problemer med afsmag i æg, mælk og kød efter fodring med større mængder rapsskrå har ligeledes den største interesse (Eggum et al. 1985).

Tannin er en heterogen gruppe af aromatiske phenol/polyphenol-forbindelser, der produceres i planter (Sørensen, 1985). Utallige forsøg har vist, at tannin har en uheldig effekt på foderets protein- og energiudnyttelse, medens de direkte årsager til problemerne er mere uklare. Dette kan skyldes, at der er tale om vidt forskellige typer af kvantitativt dominerende phenolforbindelser i forskellige plantedele og i planter, der hører til forskellige familier, slægter, arter og varieteter. Tannin vil således bestå af forskellige kombinationer af phenoliske forbindelser alt afhængig af, om de stammer fra f.eks. korn, soyaskrå, ærter eller raps. Der er således et udekket behov for afklaring af hvilke typer af phenoliske forbindelser, der giver anledning til de observerede problemer.

I rapsfrø er der et højt indhold af sinapin og andre aromatiske cholinestere, og disse stoffer bidrager væsentligt til tanninindholdet i rapsskrå/frø, når man anvender den traditionelle tanninanalyse. Det er endvidere vist, at der kan opstå »fiskeagtig« afsmag i æg ved tilstedeværelse af større mængder sinapin i hønsefoder. Der er desuden mistanke til aromatiske cholinestere i relation til rapporterede problemer med afsmag i mælk og kød hos dyr fodret med større mængder rapsskrå. De foreliggende undersøgelser har haft sigtet rettet mod belysning af nogle af de ovennævnte spørgsmål ved at tilsætte renfremstillede aromatiske cholinestere til et foder der ikke er tilsat andre stoffer fra raps. Effekten blev målt i balanceforsøg med rotter, hvor proteinets sande fordøjelighed (SF), biologiske værdi (BV), nettoproteinudnyttelse (NPU) og fordøjelig energi (FE) blev målt. Endvidere blev lever og nyre udtaget og vejte. Mave- og tarmindehold blev analyseret for phenoliske cholinestere.

**Table 1. Effekten af sinapin, p-coumaroylcholin, p-hydroxybenzoylcholin og hesperalin på foderoptagelse, tilvækst, foderudnyttelse, lever og nyrevægt**

	Aromatisk cholinester ( $\mu\text{mol/g}$ diæt)	Foderoptagelse (g tørstof /5 dage)	Rottevægte (g)	Foderudnyttelse (mg tilvækst /g tørstof)	Lever (mg/g rotte)	Nyre (mg/g rotte)
<i>Sinapin</i>						
1	0	51.6	101.5	258.2*	49.1 <sup>ac</sup>	8.0 <sup>a</sup>
2	0.5	51.6	96.8	227.9 <sup>ac</sup>	50.6 <sup>a</sup>	8.2 <sup>a</sup>
3	4.0	51.7	95.8	219.8 <sup>bc</sup>	45.5 <sup>bc</sup>	7.7 <sup>a</sup>
4	8.0	51.7	98.1	233.9 <sup>ac</sup>	48.2 <sup>ac</sup>	8.2 <sup>a</sup>
5	16.0	51.9	97.0	252.5 <sup>ac</sup>	45.5 <sup>bc</sup>	8.1 <sup>a</sup>
<i>p-Coumaroylcholin</i>						
6	0	48.1	96.3	224.8 <sup>a</sup>	41.7 <sup>a</sup>	8.5 <sup>a</sup>
7	0.5	48.3	95.4	223.9 <sup>a</sup>	39.1 <sup>ac</sup>	8.4 <sup>a</sup>
8	4.0	48.4	94.8	226.6 <sup>a</sup>	38.1 <sup>bc</sup>	7.9 <sup>ac</sup>
9	8.0	48.4	96.0	251.9 <sup>a</sup>	37.0 <sup>bc</sup>	7.8 <sup>bc</sup>
<i>p-Hydroxybenzoylcholin</i>						
10	0.5	48.3	95.8	240.1 <sup>a</sup>	49.5 <sup>a</sup>	7.9 <sup>a</sup>
11	4.0	48.4	94.0	215.9 <sup>a</sup>	49.5 <sup>a</sup>	7.9 <sup>a</sup>
12	8.0	48.4	93.7	244.2 <sup>a</sup>	45.3 <sup>b</sup>	8.0 <sup>a</sup>
<i>Hesperalin</i>						
13	0	48.0 <sup>a</sup>	97.9	279.4 <sup>a</sup>	47.6 <sup>a</sup>	7.7 <sup>a</sup>
14	0.5	48.3 <sup>a</sup>	98.5	277.8 <sup>a</sup>	41.7 <sup>bc</sup>	7.9 <sup>a</sup>
15	4.0	46.5 <sup>a</sup>	97.5	281.1 <sup>a</sup>	42.8 <sup>bc</sup>	7.9 <sup>a</sup>
16	8.0	42.9 <sup>b</sup>	98.3	290.3 <sup>a</sup>	44.6 <sup>ac</sup>	8.3 <sup>a</sup>

\* Værdier mærket med samme bogstav i samme søjle indenfor de fire behandlinger, afviger ikke fra hverandre på 95% niveauet.

### Materiale og metoder

De anvendte aromatiske cholinestere blev fremstillet ved syntese (p-coumaroylcholin, p-hydroxybenzoylcholin og 3,4-dimethoxybenzoylcholin (hesperalin)) eller isoleret fra frømateriale (sinapin). Oprensning og renfremstilling af stofferne blev foretaget ved søjlekromatografi og omkrystallisering. De fire aromatiske cholinestere blev alle anvendt i forsøgene med acetat som modion i saltene. Stofferne blev enkeltvis tilsat et standardfoder baseret på kasein + methionin, stivelse, nødvendige vitaminer og mineraler. Hver cholinester indgik i foderet i koncentrationerne: 0, 0.5, 4.0, 8.0 og for sinapin desuden 16.0  $\mu\text{mol/g}$ . I frø af dobbelt lave raps er der oftest et indhold af sinapin på 0.6–0.9%, hvilket giver 5–7.5  $\mu\text{mol/g}$  tørstof ved anvendelse af 20%

rapsskrå i foderet. Rotteforsøgene blev gennemført efter SH's sædvanlige procedure. Beskrivelse af forsøgsbetingelser og detaljer ved anvendte metoder er præsenteret i anden sammenhæng (Bille et al., 1983, Clausen et al., 1985).

**Tabel 2. Effekten af sinapin, p-coumaroylcholin, p-hydroxybenzoylcholin og hesperalin på protein- og energiudnyttelsen**

	Proteinets sande fordøjelighed (%)	Biologisk værdi (%)	Nettoprotein udnyttelsen (%)	Fordøjelig energi (%)
<i>Sinapin</i>				
1	98.2 <sup>a*</sup>	92.9 <sup>a</sup>	91.2 <sup>a</sup>	92.2 <sup>a</sup>
2	98.1 <sup>a</sup>	88.8 <sup>b</sup>	87.1 <sup>b</sup>	92.2 <sup>a</sup>
3	97.5 <sup>a</sup>	88.7 <sup>b</sup>	86.6 <sup>b</sup>	92.0 <sup>a</sup>
4	98.0 <sup>a</sup>	89.0 <sup>b</sup>	87.2 <sup>b</sup>	92.3 <sup>a</sup>
5	98.0 <sup>a</sup>	88.8 <sup>b</sup>	87.0 <sup>b</sup>	92.0 <sup>a</sup>
<i>p-Coumaroylcholin</i>				
6	98.0 <sup>a</sup>	89.3 <sup>a</sup>	87.6 <sup>a</sup>	92.2 <sup>a</sup>
7	98.8 <sup>a</sup>	90.2 <sup>a</sup>	89.1 <sup>b</sup>	93.0 <sup>a</sup>
8	98.9 <sup>a</sup>	89.7 <sup>a</sup>	88.8 <sup>ab</sup>	92.9 <sup>a</sup>
9	98.7 <sup>a</sup>	90.2 <sup>a</sup>	89.1 <sup>b</sup>	92.9 <sup>a</sup>
<i>p-Hydroxybenzoylcholin</i>				
10	98.9 <sup>a</sup>	90.4 <sup>a</sup>	89.4 <sup>a</sup>	91.4 <sup>a</sup>
11	98.4 <sup>a</sup>	90.3 <sup>a</sup>	88.8 <sup>a</sup>	92.3 <sup>b</sup>
12	98.7 <sup>a</sup>	89.6 <sup>a</sup>	88.5 <sup>a</sup>	92.6 <sup>b</sup>
<i>Hesperalin</i>				
13	98.0 <sup>a</sup>	90.8 <sup>a</sup>	89.0 <sup>a</sup>	92.4 <sup>a</sup>
14	98.4 <sup>a</sup>	91.3 <sup>a</sup>	89.9 <sup>a</sup>	92.1 <sup>a</sup>
15	98.2 <sup>a</sup>	90.4 <sup>a</sup>	88.8 <sup>a</sup>	92.1 <sup>a</sup>
16	98.7 <sup>a</sup>	90.5 <sup>a</sup>	89.3 <sup>a</sup>	92.4 <sup>a</sup>

\* Værdier mærket med samme bogstav i samme søjle indenfor de fire behandlinger, afviger ikke fra hverandre på 95% niveauet.

## Resultater

Rotternes vægt var kun ubetydeligt påvirket af p-hydroxybenzoylcholin, men ikke af de andre undersøgte aromatiske cholinesterer (Tabel 1). Dette til trods for at det højeste niveau af sinapin var betydeligt højere, end hvad der kan forventes i foder baseret på rapsskrå som eneste proteinkilde. Foderoptagelsen var negativt påvirket af hesperalin, men ikke af de andre aromatiske cholinesterer. I ingen af tilfældene fandtes en dosisrelateret effekt på foderudnyttelsen. Der var en tendens til, at p-coumaroylcholin påvirkede leverens

**Tabel 3. Koncentrationen af sinapin i diæt og maveindhold**

Diæt	2	3	4	5
µmol sinapin/g diæt	0.50	4.00	8.00	16.00
µmol sinapin/g tørstof i maveindhold	0.42±0.06	3.40±0.29	5.91±2.38	11.21±0.96

og nyrenes vægt mens der for alle de andre stoffer kun var en usikker eller ingen effekt på organvægtene.

Tabel 2 viser resultaterne fra de aromatiske cholinesteres effekt på protein- og energiudnyttelsen. Der fandtes ingen effekt fra de undersøgte stoffer på SF-værdien, selv om der har været anvendt koncentrationer af de phenoliske forbindelser i foderet, som er højere end koncentrationerne, der forekommer i foder baseret på rapsskrå som eneste proteinkilde. For sinapin har der, selv ved den største koncentration, kun været en ganske svag eller ingen effekt på BV-værdien og dermed på NPU. For alle fire aromatiske cholinesterer fandtes ingen statistisk sikker dosisrelateret effekt på BV og NPU. Ingen af de undersøgte stoffer påvirkede energiens fordøjelighed.

Tabel 3 viser resultaterne af sinapinbestemmelserne på indholdet fra maver af rotter fodret med forskellige sinapinmængder. Der sker kun en begrænset nedbrydning af sinapin i maven. Et

**Tabel 4. Koncentrationen af aromatiske cholinesterer og de tilsvarende carboxylsyrer (ac) i mave-tarmindhold fra hver af de fem rotter fodret med diæt indeholdende 8.00 µmol aromatisk cholinester pr. g diæt**

Rotte	1	2	3	4	5
<i>Hesperalin (µmol/g tørstof)</i>					
Mave	7.16	5.85	6.45	4.64	8.23
Tyndtarm (1. trediedel)	0.51	0.34	1.51	1.58	0.59
Tyndtarm (2. trediedel)	25.94	3.36	30.22	2.15	12.51
Tyndtarm (sidste trediedel)	41.70	12.57	46.49	31.85	33.01
Blindtarm	0.09	4.90	0.10		0.53
Tyktarm	3.22 (ac)	23.04 (ac)	9.29 (ac)	8.75 (ac)	9.49 (ac)
		n.d. <sup>a</sup>	0.27	4.16	1.19
	5.62 (ac)		2.22 (ac)	2.38 (ac)	2.64 (ac)
<i>4-Hydroxybenzoylcholin (µmol/g tørstof)</i>					
Mave	5.21	6.95	6.82	5.68	5.40
Tyndtarm (1. trediedel)	3.43	0.95	1.89	2.26	-
Tyndtarm (2. trediedel)	9.80	43.74	38.45	36.45	2.55
Tyndtarm (sidste trediedel)	44.78	43.12	49.14	14.20	16.92
Blindtarm	n.d. <sup>a</sup>	14.51	0.42	12.26	18.88
Tyktarm	n.d.	45.89	0.69	-	17.91 (ac)
		0.97 (ac)	1.03 (ac)		0.47
					6.52 (ac)

<sup>a</sup> n.d. betyder manglende påvisning af både cholinester og syre (ac)

tilsvarende forhold blev fundet for de tre andre aromatiske cholinestere.

Tabel 4 viser koncentrationerne af de aromatiske cholinestere i forskellige mave-tarmafsnit. Det fremgår af resultaterne, at de aromatiske cholinestere i overvejende grad bliver absorberet fra den første trediedel af tyndtarmsafsnittet. I den følgende del af tyndtarmen er der en større koncentration; dette viser blot, at de øvrige bestanddele af diæten er absorberet mere effektivt end de aromatiske cholinestere. Den del af de aromatiske cholinestere, der når frem til blind- og tyktarm, bliver i stor udstrækning spaltet ved hydrolyse, hvilket fremgår af værdierne, der er fundet for de til cholinestrene svarende carboxylsyrer.

Ved bestemmelse af tanninindholdet i de anvendte diæter fandtes en forøgelse i tannin, der er proportional med den tilsatte mængde af aromatiske cholinestere.

Af resultaterne kan det beregnes, at de aromatiske cholinestere udgør ca. 60% af det, der bestemmes som tannin i raps, når man anvender den traditionelle AOAC tanninanalyse.

### Diskussion

Undersøgelserne viser, at de aromatiske cholinestere kan gøre rede for hovedparten (ca. 60%) af det tanninindhold, der normalt findes i rapsskrå, når den traditionelle AOAC tanninanalyse anvendes. Koncentrationerne af de aromatiske cholinestere, der blev anvendt i standarddiæterne, var større end koncentrationerne, der forekommer i foder baseret på rapsskrå som eneste proteinkilde. Alligevel fandtes det, at disse stoffer ikke har nogen betydelig effekt på protein- og energiudnyttelsen. Det kan hermed fastslås, at den lavere fordøjelighed af såvel protein som

energi i rapsskrå sammenlignet med f.eks. soya-skrå ikke skyldes den del af tanninindholdet på 2-4%, der udgøres af de nu undersøgte aromatiske cholinestere. Problemerne skal snarere søges i de resterende ca. 40% af tanninindholdet, og heraf bliver specielt den del, der er i skalfractionen af interesse. Dette gælder især ved de mørkfarvede rapsfrø (de for nuværende anvendte danske sorter), så der er god grund til at interessere sig for gulfrøede raps i denne sammenhæng, idet disse frø antages at have et lavere tanninindhold.

De udførte forsøg har også vist, at de aromatiske cholinestere kan absorberes; primært fra den øverste del af tyndtarmen. Det kan derfor ikke udelukkes, at disse stoffer er involveret i de omtalte kvalitetsmæssige problemer med afsmag i æg, mælk og kød, når der fodres med store mængder rapsskrå. Tanninproblemet og dimere-oligomere forbindelser (lignaner) af aromatiske cholinestere i raps, specielt derivater af sinapin, påkalder sig særlig interesse. Dette vil blive genstand for yderligere undersøgelser i relation til afklaring af årsagerne til ovennævnte afsmagsproblemer og den ikke optimale fordøjelighed af protein og energi forbundet med raps i foderet.

### Referencer

- Bille, N.; Eggum, B. O.; Jacobsen, Ingeborg; Olsen, O.; Sørensen, H. 1983: *Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde.* 49, 148-163.
- Clausen, S.; Larsen, L. M.; Plöger, A.; Sørensen, H. 1985: *Advances in the production and utilization of cruciferous crops* (ed. Sørensen, H.). Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht. pp. 61-72.
- Eggum, B. O.; Larsen, L. M.; Poulsen, M. H.; Sørensen, H. 1985: *Advances in the production and utilization of cruciferous crops* (ed. Sørensen, H.). Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht. pp. 304-311.
- Sørensen, H. 1985: *Proceeding fra: NJF seminar Nr. 85, Ålborg 1985 Husdyrsektionen, Sektion V.*