



Statens Husdyrbrugsforsøg 1986

Meddelelse

26. SEPTEMBER

NR. 632

Nye metoder til kvantificering og karakterisering af fodermidlernes kulhydratfraktion

Af Knud Erik Bach Knudsen
Afdeling for dyrefysiologi og biokemi
Statens Husdyrbrugsforsøg

Metoder til kvantificering og karakterisering af lavmolekylære kulhydrater, stivelse, ikke-stivelsesholdige polysakkarider, β -glukaner og total fibre beskrives.

Reproducerbarheden af de benyttede analysemetoder er på højde med andre analysemetoder. Variationskoefficienten varierede fra 0,6 til 3,9%. Ved at summere indholdet af kulhydrater med råprotein ($N \times 6,25$), HCL-fedt og aske, beskrives omkring 100% af tørstoffet.

Energiindholdet i forskellige kornråvarer diskuteres i relation til kornarters kulhydratsammensætning. Af kvantitativ betydning i husdyrbruget er forholdet mellem indholdet af stivelse, der kan nedbrydes enzymatisk i tyndtarmen, og fibre, der nedbrydes af mikrofloraen i blind- og tyktarm.

Indledning

Kulhydraterne udgør i størrelsesordenen 70–80% af tørstofindholdet i de forskellige kornråvarer og -biprodukter. I de proteinrige fodermidler, som f.eks. sojaskrå, raps og ærter, er kulhydratandelen lavere, men udgør dog i de fleste vegetabiliske produkter typisk 40–60% af tørstofindholdet.

Kulhydraterne kan kemisk karakteriseres ved deres indhold af lavmolekylære kulhydrater (sukker), reserve polysakkarider og ikke-stivelsesholdige polysakkarider (NSP). De lavmolekylære kulhydrater kan yderligere opdeles i monosakkarider, disakkarider og oligosakkarider; reserve polysakkarider i stivelse og fruktan og NSP i cellulose og ikke-celluloseholdige polysakkarider (NCP). NCP omfatter hemicellulose, β -glukan, pektin m.m.

Enmavede dyr kan nedbryde de fleste naturligt forekommende disakkarider og stivelse ved enzymatisk hydrolyse. Denne proces foregår i tyndtarmsafsnittet ved udskillelse af α -amylaser og ved maltose-, sukrose- og laktospaltende enzymer placeret på tarmvilli. I modsætning hertil findes der ikke i tyndtarmsafsnittet enzymer, der kan hydrolysere bindingerne i oligosakkarider, fruktan og i NSP. Disse kulhydrater vil derimod kunne nedbrydes af mikrofloraen i blind- og tyktarm. Ved den mikrobielle fermentering i blind- og tyktarm omdannes kulhydraterne til kortkædede fedtsyrer, der absorberes og dermed bidrager til dyrets energiforsyning. Ved beregning af fodermidlernes energiindhold ud fra kemiske analyser vil det derfor være af stor betydning at opdele kulhydratfraktionen i de komponenter, der nedbrydes enzymatisk, og de kulhydrater,

der omsættes via mikrobiel fermentering i blind- og tyktarm.

Lignin er i mange plantecellevægge stærkt associeret til henholdsvis cellulose og hemicellulose. Lignin har derfor en afgørende indflydelse på den mikrobielle nedbrydning af plantecellevægge hos flermavede såvel som hos enmavede dyr. NSP plus lignin defineres i den humane ernæring som kostfibre («Dietary Fibre» = DF).

I denne meddelelse beskrives de kulhydratanalysemetoder, der benyttes på Dyrefysiologisk Afdeling til kvantificering og karakterisering af fodermidlernes (primært kornråvarernes og -biprodukternes) kulhydratfraktion.

Metoder

Lavmolekylære kulhydrater, der inkluderer bestemmelse af fruktan, ekstraheres med en 0.1 M Na-acetat-buffer, hvorefter prøverne centrifugeres. Fra ekstraktet udtages en prøve til bestemmelse af fri glukose og fruktose, medens en parallelprøve hydrolyseres med 0.037 M H₂SO₄. I hydrolysatet bestemmes ligeledes glukose og fruktose. Både den frie glukose og fruktose og glukose og fruktose i ekstraktet bestemmes i en koblet enzymatisk reaktion med nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (NADP), der måles spektrofotometrisk. Ud fra indholdet af glukose og fruktose i ekstrakt og hydrolysat kan indholdet af fri glukose og fruktose samt af sukrose og fruktan bestemmes.

Stivelse forklistres i kogende vandbad under samtidig indvirkning af et varmostabilt α -amylase (E.C. 3.2.1.1.) (Termamyl® 120L). Herved nedbrydes stivelsen til mono- og oligosakkarider med en kædelængde på 1–10 glukoseenheder. Fuldstændig hydrolyse til monosakkarider foretages med amyloglukosidase (E.C. 3.2.1.3.). Mængden af glukose bestemmes kvantitativt med glukoseoxidase og konverteres til polysakkarid med faktoren 0.9.

Ved bestemmelse 1,3:1,4 β -glukaner er der benyttet to forskellige metoder. Den ene metode bygger på en enzymatisk hydrolyse af stivelse med Termamyl og amyloglukosidase efterfulgt af en fældning af opløselige β -glukaner med 80% ethanol. I det efterfølgende trin hydrolyseres β -glukanerne med en β -glukanase og de frigierte glukoseenheder kvantificeres med glukoseoxi-

dase og konverteres til polysakkarider med faktoren 0.9. Ved den anden metode, der er væsentlig mindre arbejdskrævende og hurtigere at udføre, ekstraheres β -glukanerne med 0.075 M H₂SO₄ ved 100°C i 10 min. I næste trin bestemmes indholdet af β -glukan i en reaktion med Calcoflour, der måles flourometrisk. Indholdet af β -glukan bestemmes mod en standardkurve med ren β -glukan.

Totalindholdet af fibre (TDF) bestemmes ved en enzymatisk gravimetrisk metode. Stivelsen hydrolyseres med et varmostabilt α -amylase (Termamyl) og proteinet med henholdsvis pepsin og pankreatin. Ved denne metode kan total fibre opdeles med hensyn til opløselighedsforhold i henholdsvis opløselige (SDF) og uopløselige fibre (IDF).

Fiberfraktionens sammensætning bestemmes ved hydrolyse af fiberpolysakkarider til sukkermonomere med H₂SO₄ og efterfølges af reduktion, derivatisering og kvantificering af de enkelte sukkermonomere på gaskromatograf. Restfraktionen, der er resistent mod H₂SO₄-hydrolyse, defineres som Klason lignin. Uronsyre bestemmes konduktometrisk efter decarboxylering af uronsyrens syregruppe og måles som ændringen af ledningsevnen i en NaOH-opløsning. Ved summering af sukkermonomere bestemt ved gaskromatografi og uronsyre fås indholdet af NSP.

Resultater og diskussion

Variationskoefficienten for de forskellige kulhydratanalyser varierede fra 0.6% for stivelse til 3.9% for lavmolekylære kulhydrater (tabel 1 og 2). Den højere variationskoefficient for lavmolekylære kulhydrater skyldes primært det lave indhold i tørstof, hvilket generelt giver en højere variation. Variationskoefficienten for fri fruktose, der udgør 0.1% af tørstoffet, er således 10.6%, hvorimod den kun er 0.6% for stivelse, der udgør 58.6% af tørstoffet. Analyseresultaterne tyder ikke på, at kompleksiteten i analysen er af afgørende betydning. Reproducerbarheden af DF bestemt gaskromatografisk er således, højere end ved gravimetrisk bestemmelse. Dette til trods for at den gaskromatografiske metode involverer væsentlig flere analysetrin og dermed muligheder for fejlkilder. Til sammenligning for de i tabel 1 og 2 viste variationer kan nævnes, at reproducer-

Tabel 1. Indhold (% af tørstof) og reproducerbarhed (CV = $\frac{s}{x} \cdot 100$) af lavmolekylære kulhydrater, stivelse og fibre (TDF, IDF og SDF) i byg (n = 50)

	% af tørstof	CV %
<i>Lavmolekylære kulhydrater:</i>		
Glukose	0.2	6.9
Fruktose	0.1	10.6
Sukrose	1.3	5.2
Fruktan	0.6	8.3
Total	2.2	3.9
Stivelse	58.6	0.6
<i>Fibre:</i>		
Opløselige (SDF)	4.2	9.4
Uopløselige (IDF)	18.1	2.4
Total (TDF)	22.3	2.5

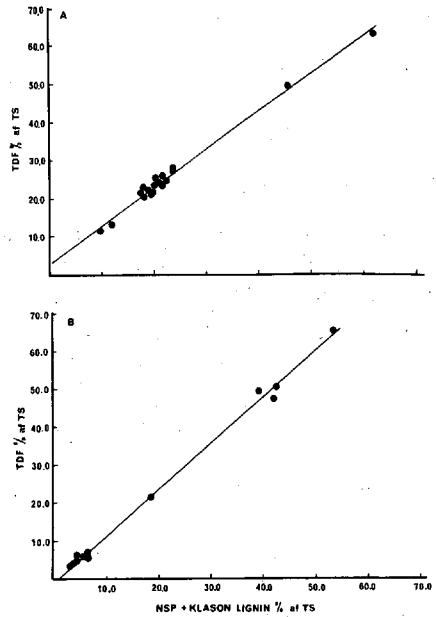
Tabel 2. Indhold (% af tørstof) af ikke-stivelsesholdige polysakkarider (NSP), Klason lignin, total fibre (DF) og total fibre bestemt gravimetrisk (TDF) af byg samt reproducerbarheden af metoderne (CV = $\frac{s}{x} \cdot 100$)

	% af tørstof	CV %
<i>NSP:</i>		
Arabinose	2.1	4.4
Xylose	4.5	2.0
Mannose	0.3	2.3
Galaktose	0.3	10.2
Glukose	9.2	2.9
Uronsyre	0.7	6.9
Total NSP	17.1	2.1
Klason lignin	2.9	1.3
DF	20.0	1.8
TDF ¹⁾	22.3	2.5

¹⁾ Gravimetrisk bestemt.

barheden for foderstofanalyser som aske, HCl-fedt, protein og træstof typisk vil ligge i området 1–3%. Ud fra disse resultater kan det sluttes, at reproducerbarheden af de benyttede kulhydrat-metoder er tilfredsstillende og på højde med andre foderstofanalyser.

En summation af hovedkomponenterne: lavmolekylære kulhydrater, stivelse, fibre, råprotein, HCl-fedt og aske viser, at disse beskriver omkring 100% af fodertørstoffet (tabel 3). At summation generelt giver mere end 100% kunne indikere, at visse komponenter tælles med to gange som følge af uspecificitet i de benyttede analyser. Dette er sandsynligvis ikke tilfældet. Derimod kan årsagen ligge i konverteringen af nitrogen til



Figur 1.

Sammenhængen mellem total fibre bestemt gaskromatografisk (NSP + Klason lignin) og gravimetrisk (TDF) i prøver af byg (A):

$$TDF = 2.8 + 1.00 (NSP + Klason lignin); R^2 = 0.989$$

og i prøver af hvede (B):

$$TDF = -0.8 + 1.22 (NSP + Klason lignin); R^2 = 0.997$$

Tabel 3. Kemisk sammensætning af forskellige kornarter (% af tørstof)

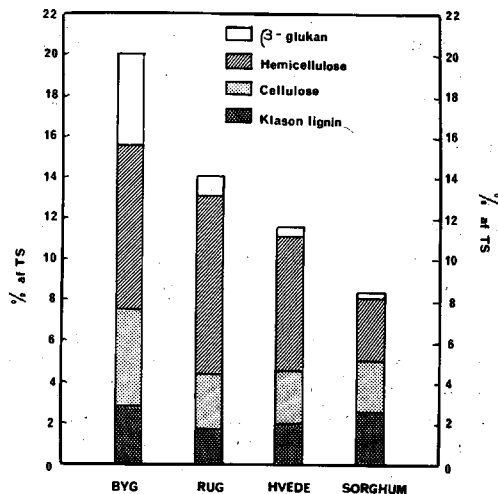
	Byg	Rug	Hvede	Triticale	Sorghum
Antal prøver:	50	8	8	10	3
<i>Lavmolekylære kulhydrater:</i>					
Glukose	0.2	0.3	0.1	0.4	0.2
Fruktose	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Sukrose	1.3	2.5	1.2	1.9	0.7
Fruktan	0.6	3.3	1.1	1.1	0.1
Total	2.2	6.2	2.5	3.5	1.1
Stivelse	58.6	63.6	69.6	64.1	73.0
<i>Fibre:</i>					
Opløselige (SDF)	4.2	3.6	0.9	2.2	0.8
Uopløselige (IDF)	18.1	12.5	11.6	12.3	8.5
Total (TDF)	22.3	16.1	12.5	14.5	9.3
Råprotein (N × 6,25)	11.9	10.4	11.7	14.5	12.0
HCl-fedt	3.4	2.6	3.2	2.6	3.3
Aske	2.2	1.8	1.6	1.7	1.6
Total	100.6	100.8	101.1	100.9	100.3

protein. F.eks. er der fortsat diskussion omkring faktoren 6.25. En lavere omregningsfaktor, som vil være relevant for hvede, rug og sorghum og sandsynligvis også triticale, vil give en værdi, der er tættere på 100%. Resultaterne i tabel 3 viser imidlertid klart, at det er muligt ud fra de viste analyser kvantitativt at beskrive variationen i tørstoffets sammensætning.

Sammenhængen mellem den gaskromatografiske og gravimetrisk metode til bestemmelse af fibre er tilfredsstillende (figur 1). Gennemgående findes et lavere indhold af fibre ved den gaskromatografiske metode end ved den gravimetrisk metode. Disse forskelle skyldes primært, at forskellige fenoliske syrer, der er associeret til polysakkariderne i cellevæggene, ikke bliver bestemt ved den gaskromatografiske bestemmelse. De vil derimod blive inkluderet i den gravimetrisk bestemmelse af fibre. Som det fremgår af tabel 2, er forskellen mellem de to metoder 2.3% for byg. Forskellen kan dog blive væsentlig højere for rene skaldele.

Indholdet af lavmolekylære kulhydrater er lav i samtlige kornarter. For byg, hvede, triticale og sorghum (milo) varierer indholdet fra 1.1 til 3.5%. Sukrose er den største komponent og udgør fra ca. 50 til 65% af de lavmolekylære kulhydrater. I rug er indholdet af lavmolekylære kulhydrater væsentlig højere (totalt 6.2%), hvilket primært skyldes et højt indhold af fruktan. Indholdet af stivelse og fibre er invers korreleret. Byg har det laveste indhold af stivelse, men til gengæld det højeste indhold af fibre, hvorimod det modsatte gør sig gældende for sorghum.

Forskellen i energiindholdet af de kornråvarer, der er vist i tabel 3 og figur 2, kan forklares direkte ved den detaljerede kulhydratanalyse. I henhold til foderstoffatabellen er indholdet af foderenheder til svin 1.10 FE_S/kg for hvede og sorghum sammenlignet med 0.99 FE_S/kg for byg. Det



Figur 2.

Indhold af β -glukan, hemicellulose, cellulose og Klason lignin i byg, rug, hvede og sorghum.

lavere energiindhold i byggen skyldes, at denne har 11–14% lavere indhold af stivelse og et 10–13% højere indhold af fibre. Som nævnt i indledningen, kan stivelsen næsten fuldstændig nedbrydes af enzymer i tyndtarmen, hvorimod kun en del af fibre vil blive nedbrudt af mikrofloraen i blind- og tyktarm. Sammensætningen af byggens fiberfraktion tyder ligeledes på, at denne er vanskeligere at nedbryde end fiberfraktionen i hvede og sorghum, først og fremmest på grund af det højere indhold af lignin og cellulose.

Det kan slutes, at en detaljeret analyse af kulhydratfraktionens sammensætning gør det muligt at opsplitte kulhydraterne med hensyn til, om disse kan fordøjes enzymatisk i tyndtarmen, eller om disse for at kunne udnyttes fermenteres i blind- og tyktarm. Med udgangspunkt i disse analyser er der åbnet mulighed for en mere korrekt bestemmelse af foderets energiindhold ud fra kemiske analyser, end hvad det er muligt ud fra den traditionelle foderstoffanalyse.