



28. APRIL

NR. 743

Laboratoriemetode til bestemmelse af foderets protein- og energifordøjelighed

*Sigurd Boisen**
Centrallaboratoriet

En laboratoriemetode (in vitro metode) til bestemmelse af fordøjeligheden af foderets protein og energi er udviklet. Metoden er tilstræbt at efterligne de fysiologiske betingelser bedst muligt under hensyntagen til praktiske laboratorieforhold. Proteinfordøjeligheden bestemmes efter inkubation med maveenzymet pepsin ved pH 2 efterfulgt af inkubation med en enzymblanding fra bugspytkirtlen (pancreatin) ved pH 6.8. Energifordøjeligheden i tyndtarmen bestemmes på grundlag af den samtidigt bestemte tørstoffordøjelighed. Energifordøjeligheden i blind- og tyktarmen bestemmes efter en yderligere inkubation med vombakterier under anaerobe betingelser.

De herved bestemte in vitro fordøjeligheder af protein og energi i en række almindelige foderstoffer er i god overensstemmelse med in vivo resultater opnået med såvel rotter som grise.

Indledning

Ved fremstilling af optimerede foderblandinger er det bl.a. vigtigt at have det bedst mulige kendskab til foderkomponenternes indhold af fordøjelig energi og fordøjelige essentielle aminosyrer. Som grundlag herfor anvendes i øjeblikket i vid udstrækning tabelværdier for indhold og fordøjelighed, der dog for mange foderstoffers vedkommende kan variere betydeligt. En direkte bestemmelse af såvel indhold som fordøjelighed af protein og energi i det enkelte foderstofparti vil derfor give bedre mulighed for at fremstille korrekt sammensatte foderblandinger. En forudsætning herfor er imidlertid, at det er muligt at bestemme fordøjeligheden ved en hurtig laboratoriemetode (in vitro metode).

Ved Statens Husdyrbrugsforsøg er der allerede udviklet og afprøvet flere forskellige metoder til

bestemmelse af foderkomponenters fordøjelighed. Således blev en hurtig og simpel metode til bestemmelse af proteinfordøjeligheden (pH-stat metoden) beskrevet i Medd. nr. 500, medens en metode til bestemmelse af fordøjeligheden af organisk stof hos svin er beskrevet i Medd. nr. 682.

I denne meddelelse beskrives udviklingen og afprøvningen af en laboratoriemetode, der tilsigter at bestemme proteinfordøjeligheden i tyndtarmen og energifordøjeligheden i henholdsvis tyndtarmen og blind- og tyktarmen. I udviklingen af metoden er det tilstræbt at optimere betingelserne under hensyntagen til relevante fysiologiske betingelser m.h.t. inkubationstider, enzymkoncentrationer, pH, temperatur o.s.v. Resultaterne sammenlignes med tilsvarende resultater opnået i fordøjelighedsforsøg med svin og rotter.

* Nuværende adresse: Afdelingen for forsøg med svin og heste.

Materialer og metoder

Alle anvendte prøver er udtaget fra foderstofpartier eller foderblandinger, hvorpå fordøjeligheden af protein og energi hos svin og/eller rotter er blevet bestemt. Til optimering af metoden er anvendt prøver af byg, sojaskrå og rapsskrå.

I den endelige metode inkuberes 1 g fint formalet prøve (< 1 mm) ved pH 2 i 35 ml fort. saltsyre tilsat 10 mg pepsin (oprenset fra svinemaver). For at undgå bakterievækst blev der desuden tilsat antibiotika (2,5 mg chloramphenicol). Inkuberingen udføres ved 39°C i 6 timer. Derefter justeres blandingens pH til 6,8, og der tilsættes 25 mg pancreatin (enzypulver fra frysetørrede svinebugspytkirtler). Prøven inkuberes yderligere i 16 timer (natten over). Opløste, men ikke fordøjede, proteiner fældes med sulfosalicylsyre (2% i blandingen) og prøven filtreres gennem en glasfilterdigel med ca. 0,5 g Celite i et Tecator træstofapparat. Herved udvaskes også det tilsatte antibiotikum. I den ufordøjede rest bestemmes tørstof- og kvælstofindholdet. Til en parallelt inkuberet prøve tilsættes yderligere 20 ml vomvæske, hvorfra protozoer og foderrester er fjernet ved centrifugering. De herved isolerede bakterier svarer til dem, der findes i blind- og tyktarmen. Inkuberingen udføres anaerobt i en CO₂-atmosfære i 2 døgn. Prøven filtreres og tørres, hvorefter tørstof- og energiindholdet i den ufordøjede rest bestemmes. I alle tilfælde kan fordøjeligheden beregnes på grundlag af indholdet i henholdsvis den oprindelige prøve og i den ufordøjede rest.

Da tørstof- og energifordøjeligheden i de fleste foderstoffer er næsten sammenfaldende, kan energibestemmelsen oftest udelades.

Resultater og diskussion

Under optimeringen af metoden blev det konstateret, at inkubationsblandingens pH under pepsinfordøjelsen havde en relativ stor betydning for resultatet for bl.a. sojaskrå – jo lavere pH desto mere effektivt bliver proteinet fordøjet (tabel 1). Da mavens pH kan variere en del hos dyrene, kan denne effekt måske være med til at forklare den relativt store variation, man undertiden kan konstatere i dyreforsøg. Inkubering ved pH 2

Tabel 1. Effekt af inkubationstid og pH under pepsinfordøjelsen på proteinets fordøjelighed (%)

	Inkub.tid (timer)	pancreatin (±) ¹⁾	pH		
			1,5	2,0	3,0
<i>Byg</i>	3	–	53,0	53,4	51,1
	6	–	58,6	57,4	58,0
	3	+	86,0	84,2	83,1
	6	+	86,8	85,3	85,3
<i>Sojaskrå</i>	3	–	73,6	66,7	52,8
	6	–	78,5	72,5	52,6
	3	+	90,3	88,8	80,2
	6	+	90,9	89,8	80,6
<i>Rapsskrå</i>	3	–	63,0	64,2	50,0
	6	–	68,5	61,8	53,9
	3	+	83,5	82,1	80,2
	6	+	83,2	82,6	81,2

¹⁾ med eller uden efterfølgende inkubation med pancreatin i 16 timer.

synes at give den bedste simulering af in vivo betingelserne.

De herved bestemte proteinfordøjeligheder i en række forskellige foderstoffer blev sammenlignet med resultater for sandt fordøjeligt protein bestemt i rotteforsøg. Det fremgår af tabel 2, at der gennemgående er god overensstemmelse mellem in vitro og in vivo bestemmelserne. Variationer i in vivo fordøjeligheden inden for samme foderstofftype afspejles også i in vitro resultaterne. Kun lupin giver en klar forskel i resultaterne med

Tabel 2. In vitro fordøjeligt protein sammenlignet med in vivo (rotter) sandt fordøjeligt protein i forskellige vegetabiliske foderstoffer

	in vitro	in vivo
		middel ± SD
Rapsskrå	83,6	83,6 ± 1,2
Byg	84,9	85,8 ± 1,6
Rug 1	86,9	85,5 ± 2,2
Rug 2	89,4	91,3 ± 1,0
Rug 3	90,7	92,7 ± 0,8
Hvede 1	90,5	92,8 ± 0,9
Hvede 2	90,5	89,5 ± 3,9
Hvede 3	91,1	90,2 ± 1,2
Hvede 4	92,2	91,9 ± 1,6
Hestebønne	95,1	96,0 ± 3,4
Lupin 1	97,7	86,5 ± 2,9
Lupin 2	98,6	89,2 ± 1,3

Tabel 3. In vitro fordøjeligt protein bestemt med henholdsvis pepsin-pancreatin metoden og pH-stat metoden sammenlignet med in vivo (grise) sandt fordøjeligt protein i forskellige bygsorter, dyrket med og uden kvælstofgødskning

	in vivo	in vitro	
		pepsin-pancreatin	pH-stat
<i>Gødsket</i> ¹⁾	middel ± SD		
Zita	86,8 ± 0,8	85,9	86,6
Romi	86,2 ± 3,3	86,3	86,1
Inga	85,0 ± 1,0	86,9	86,6
Piggy	80,9 ± 2,8	80,8	83,5
<i>Ugødsket</i>			
Zita	79,4 ± 3,0	81,2	86,2
Romi	79,5 ± 2,5	81,8	85,7
Inga	76,4 ± 3,5	79,9	86,6
Piggy	74,6 ± 5,1	80,7	86,6

¹⁾ 180 kg N/ha.

in vivo og in vitro metoden. Den relativt lave in vivo fordøjelighed kan muligvis skyldes alkaloidindholdet i lupiner, der kraftigt nedsætter foderoptagelsen og dermed formentligt medfører et relativt stort tab af endogent protein.

In vivo resultaterne i tabel 2 og følgende tabeller er gennemsnit af 5 observationer. På grund af den biologiske variation og forsøgsusikkerhed er der en forholdsvis stor spredning – angivet som standardafvigelse (SD). In vitro resultaterne er derimod gennemsnit af to bestemmelser. Gentagne bestemmelser med såvel pH-stat metoden som med pepsin-pancreatin metoden har vist, at in vitro metoderne har en meget god reproducerbarhed.

Proteinfordøjeligheden hos svin i forskellige gødskede og ugødskede bygsorter blev sammenlignet med såvel den omhandlede in vitro metode (pepsin-pancreatin metode) som med pH-stat metoden, der er omtalt i indledningen. Det fremgår af tabel 3, at pepsin-pancreatin metoden ud-

mærket registrerer forskellene såvel mellem almindelige bygsorter og højlysinmutanten Piggy, som mellem partier af samme sort, der stammer fra forskellige gødskede marker. pH-stat metoden viser derimod næsten den samme fordøjelighed i alle undersøgte bygprøver. Ved undersøgelse af en række andre foderstoffer har der dog været en rimelig god overensstemmelse mellem de to in vitro metoder.

For at undersøge effekten af gødskning på de forskellige proteinfraktioner i en almindelig bygsort (Inga) og bygmutanten Piggy, blev der udført en række ekstraktionsundersøgelser. Det fremgår af tabel 4, at ved gødskning sker der en relativ forøgelse af de lettest fordøjelige proteinfraktioner (hordeiner og gluteliner), hvilket forklarer den øgede fordøjelighed. Hos Piggy (der stort set ikke indeholder det lysinfattige hordein) har en øget gødskning derimod næsten ingen effekt på proteinets sammensætning, hvilket forklarer, at proteinfordøjeligheden i Piggy tilsyneladende er upåvirket af gødskning.

Den lavere fordøjelighed af Piggy fremgår også af Medd. nr. 716, der beskrev et forsøg med forskellige svinefoderblandinger, hvor fordøjeligheden af protein og energi blev bestemt i forsøg med såvel svin som rotter. Af tabel 5 fremgår det, at in vitro fordøjeligheden af kvælstof svarer meget nøje til de resultater, der blev opnået med in vivo bestemmelserne.

Tabel 6 viser energifordøjeligheden fra samme forsøg. Her viser in vitro resultaterne også stor overensstemmelse med resultaterne fra svineforsøget, medens rotterne havde en lavere energifordøjelighed i foderblandingerne med sojaskrå.

Energifordøjeligheden i tyndtarmen hos grisene blev ikke bestemt i dette forsøg, men er beregnet ud fra værdier for byg, sojaskrå og raps i et

Tabel 4. Ekstraktionsundersøgelser til bestemmelse af bygproteinfraktionernes afhængighed af sort og gødskning.

Gødsket ¹⁾ (±)	Kvælstof (% af total)				Uopløst N
	Alb. + Glob. (1% NaCl)	Hordeiner (80% EtoH)	Gluteliner (0,1 M NaOH)		
Inga	–	35,6	15,8	29,3	19,2
Inga	+	22,0	26,3	38,0	13,7
Piggy	–	43,2	1,4	37,6	17,8
Piggy	+	44,1	2,4	33,9	19,7

Tabel 5. In vitro fordøjeligt protein i svinefoderblandinger sammenlignet med in vivo sandt fordøjeligt protein bestemt med henholdsvis grise og rotter

	grise		rotter		in vitro
	middel ± SD		middel ± SD		
Byg + 24% sojaskrå	86,8 ± 2,6		85,0 ± 1,9		85,6
Byg + 18% sojaskrå	88,1 ± 1,4		84,6 ± 1,2		85,5
Lami + 4% rapsskrå	83,0 ± 4,2		83,8 ± 1,3		84,0
Piggy + 4% rapsskrå	77,1 ± 3,3		79,2 ± 2,3		78,7

tidligere forsøg ved Statens Husdyrbrugsforsøg. Det fremgår, at in vitro fordøjeligheden henholdsvis med og uden fermentering med vombakterier i 2 døgn svarer ganske godt til de beregnede værdier.

De opnåede resultater viser, at det er muligt at bestemme fordøjeligheden af såvel protein som energi i almindelige vegetabiliske foderstoffer. Det synes ovenikøbet også at være muligt at skelne mellem den energi, der fordøjes i henholdsvis tyndtarmen og blind- og tyktarmen. Dette er af betydning, da energiværdien af de absorberede flygtige fedtsyrer, der dannes ved den mikrobielle forgæring i blind- og tyktarmen kun udgør ca. 60% af den herved fordøjede energi.

Medens det ufordøjelige energi hovedsageligt stammer fra ufordøjelige fibre, vil det ufordøjelige protein være dels aminosyrer og andre N-forbindelser, der er bundet til fibre, dels proteiner med en kompakt struktur, der gør dem vanskeligt

nedbrydelige under fysiologiske betingelser.

I forbindelse med fordøjelsesprocesserne er der imidlertid også et tab af endogent protein (fordøjelsesenzymer, udskilt slim i spyt og tarm-saft (mucin) og afstødte tarmepithelceller i mave-tarmkanalen). Dette tab er især afhængig af foderets tørstofmængde, men også af foderets indhold af fibre og en række andre stoffer, der nedsætter nettofordøjelsen (antinutritionelle faktorer).

Den bedste måde at fastlægge nettofordøjeligheden ved rutinebestemmelser må derfor være at bestemme in vitro fordøjeligheden (= den sande fordøjelighed) og korrigerer for det endogene forbrug, der i gennemsnit udgør ca. 9 g råprotein/kg tørstof. Denne værdi vil kunne justeres i henhold til empirisk fundne påvirkninger af fibre og anti-nutritionelle faktorer, hvis koncentration bestemmes i foderstoffet.

Undersøgelser herover er i gang og resultaterne herfra vil fremgå af en senere meddelelse.

Tabel 6. In vitro fordøjeligt tørstof i svinefoderblandinger sammenlignet med in vivo fordøjeligt energi bestemt med henholdsvis grise og rotter.

	in vivo		in vitro		in vivo (grise) ¹⁾	
	grise	rotter	pp ²⁾	pp-vs ³⁾	ileum	gødning
Byg + 24% sojaskrå	82,8	77,5	70,3	84,3	71,3	82,7
Byg + 18% sojaskrå	83,8	77,5	70,6	84,0	71,4	82,2
Lami + 4% rapsskrå	79,5	78,4	67,8	79,7	71,6	80,8
Piggy + 4% rapsskrå	75,0	74,6	62,0	75,8	-	-

1) Beregnet ud fra angivne fordøjeligheder i ileum og gødning for henholdsvis byg, sojaskrå og rapsskrå (Just et al., 1985, *Livest. Prod. Sci.* 12, 145).

2) Inkuberet med pepsin og derefter pancreatin.

3) Inkuberet med pepsin, derefter pancreatin og til sidst med vomsaft.