



Studier over fytinsyrenedbrydning i mave-tarmkanalen hos slagtesvin

Torben Larsen, Afd. for Dyrefysiologi og Biokemi

Ann-Sofie Sandberg, Chalmers Tekniska Högskola c/o SIK, Göteborg

Brittmarie Sandström, Forskningsinstitut for Human Ernæring, KVL

Foderets naturlige indhold af fytinsyre hæmmer dyrenes optagelse af mineraler. Tidligere forsøg har dog vist, at fytinsyre nedbrydes i dyrenes tarmsystem. Desuden er det observeret, at kalciumtildeling til foderet nedsætter denne fytinsyrenedbrydning.

Nærværende undersøgelse blev indledt for at følge nedbrydningen af fytinsyre i mave-tyndtarmsafsnittene og blind- og tyktarmsafsnittene hos voksende grise. Desuden var det hensigten at undersøge virkningen af foderets kalciumniveau på denne fytinsyrenedbrydning.

Nedbrydningen af fytinsyre i mave-tyndtarmsregionen var 35-45% for svin på et rapsskrå-stivelses foder, uanset kalciumniveauet. Svin på et byg-hvede-sojaskrå foder nedbrød derimod omkring 66% af fytin-

syren i de samme tarmafsnit. Nedbrydning af fytinsyre fortsatte i blind- og tyktarmsafsnittene, men blev her hæmmet af foderets kalciumindhold.

Rapsskråfoderet indeholdt ikke plante-fytaser, der kunne nedbryde fytinsyren; nedbrydningen af fytinsyre må derfor være foretaget af mere eller mindre specifikke enzymer fra dyret selv eller tarmens flora. Byg-hvede-sojaskrå foderet indeholdt plantefytaser og viste et nedbrydningsmønster, der kunne tyde på, at plantefytaserne også har medvirket i nedbrydningen af fytinsyre i fordøjelseskanaalen.

Undersøgelsen viser desuden, at kalciumkarbonat kan passere svinenes tarmsystem og ende i gødningen, selv om det teoretisk skulle omdannes ved reaktion med mavens saltsyre.

Indledning

Fytinsyre (inositol 6-fosfat) er mængdemæssigt den væsentligste fosforforbindelse af planteoprindelse i foderstoffer. Fosfat bundet i fytinsyremolekylet er imidlertid ikke umiddelbart tilgængeligt for absorption og kan således bidrage til høje koncentrationer af fosfor i gødningen. Spaltning af fytinsyre er en enzymatisk hydrolyse. Processen kan finde sted ved hjælp af naturlige plantefytaser, fytaseaktivitet fra tarmens mucosaceller eller ved mikrobielle fytaser.

Endvidere hæmmer fytinsyre absorptionen af andre mineraler (Ca, Fe, Zn, Mg) ved at danne uopløselige komplekser ved fysiologiske pH-værdier. Styrken, hvormed mineralerne bindes til fytinsyre, aftager med antallet af fytinsyrens fosfatgrupper og opløseligheden af forbindelserne stiger, når fosfatgrupper spaltes fra inositol 6-fosfat. Nedbrydningsgraden og rækkefølgen af fosfatfraspaltningen fra fytinsyre er derfor af betydning for det ernæringsmæssige udbytte af foder med moderat til højt fytinsyreindhold.

Svinefoder er overvejende baseret på fodermidler af planteoprindelse, med et relativt lavt indhold af kalcium. Kalciumsalte tildeles derfor oftest som supplement til foderet. Høje indtag af kalcium har dog i tidligere un-

dersøgelser vist sig, at nedsætte fytinsyreindbrydningen hos rotter, svin og hos mennesker.

Omkring 70% af det totale fosfor i rapsskrå er bundet som fytinsyrefosfat. Rapsskrå benyttes udbredt som proteinfoder til produktionsdyr; fodermidlet er karakteriseret ved et højt fytinsyreindhold og ingen eller meget lille fytaseaktivitet pga. varmebehandling og olieekstraktion. Disse forhold peger i retning mod en lav fytinsyreindbrydning og – som en konsekvens heraf – en lav udnyttelsesgrad af fosfor og muligvis andre mineraler, der er tilstede i rapsskrå.

Hensigten med nærværende undersøgelse var at belyse indflydelsen af foderets kalciumniveau på fytinsyreindbrydningen i mave-tarmkanalen hos svin fodret med rapsskrå. Desuden var det hensigten at lokalisere, hvor i tarmkanalen denne nedbrydning fandt sted. De svin, der indgik i undersøgelsen var fistuleret ved enden af tyndtarmen (ileum), hvilket gav mulighed for at skelne fytinsyrehydrolysen i mave-tyndtarmsregionen fra hydrolysen i blind- og tyktarmsregionen.

Materialer og metoder

Femten sogrise med en begyndelsesvægt på ca. 30 kg fik indsat ileumkanyler umiddelbart før tyndtarmens udmunding i blind-

Tabel 1. Forsøgsfoderets sammensætning, alle værdier i g/kg foder

	Raps diæt 1-3		'Kontrol' diæt
Rapsskrå	400,0	Sojaskrå	140,0
Majsstivelse	597,0	Byg	600,0
Natriumklorid	2,5	Hvede	204,0
Vitaminer *	0,5	Foderfedt	20,0
raps diæt 1			
Kalciumkarbonat	0,0	Melasse	10,0
raps diæt 2			
Kalciumkarbonat	9,2	Di-kalcium-fosfat	12,0
raps diæt 3			
Kalciumkarbonat	18,5	Kalciumkarbonat	8,0
		Natriumklorid	4,0
		Mikromineralvitamin mix *	2,0

* Vitaminer tilsat efter norm.

Tabel 5. Udvikling af gas fra foder, tyndtarmsmateriale og fæces, efter tilsætning af stærk syre, målt i et manometer. Værdierne er udtrykt i kalciumkarbonat-ækvivalenter (mg) pr g tørstof.

Diæt	Foder		Tyndtarmsmateriale		Fæces	
Raps 1	11,5 ^d		10,7 ^b		11,9 ^d	
Raps 2	18,2 ^c		17,3 ^b		23,7 ^c	
Raps 3	27,8 ^a		30,3 ^a		47,5 ^a	
'Kontrol'	24,2 ^b		17,6 ^b		34,0 ^b	
SE	0,4		4,8		3,5	

SE er den statistiske tests spredning
Værdier i samme søjle med forskellige bogstavspåskrift er signifikant forskellige ($p < 0.01$) mellem diæter.

Tabel 6. pH og den syremængde, der tilsættes foder, tyndtarmsmateriale og fæces. pH blev målt efter henstilling i 1 time (0.9 g TS/20 ml dest. vand). Syremængden (1 N HCl) tilsat denne opslæmning for at opnå pH 0.6 er opgivet i ml.

Diæt	Foder		Tyndtarmsmateriale		Fæces	
	pH	syre	pH	syre	pH	syre
Raps 1	6,0 ^c	9,6 ^b	7,0	12,1	6,5 ^c	12,6 ^b
Raps 2	6,1 ^b	9,9 ^a	7,5	12,6	6,7 ^b	12,9 ^{ab}
Raps 3	6,1 ^a	10,0 ^a	7,3	12,5	6,7 ^{ab}	13,3 ^a
'Kontrol'	6,0 ^d	9,9 ^a	7,3	12,1	6,9 ^a	12,5 ^b
SE	0,02	0,12	0,3	0,4	0,1	0,3

SE er den statistiske tests spredning
Værdier i samme søjle med forskellig bogstavspåskrift er signifikant forskellige, $p < 0.05$

diæten uden Ca-supplement og på det lave Ca-supplement. Prøverne på disse diæter viste en større nedbrydning i blind- og tyktarmen end i mave- tyndtarmsafsnittene. På det højeste kalciumniveau var der imidlertid ikke signifikant forskel på mængderne af fytinsyre genfundet i tyndtarmsindholdet sammenlignet med fæcesindholdet (tabel 4). Kontrol diæten, der også indeholdt en betydelig mængde kalcium, viste samme mønster.

Nedbrydningsprodukterne af fytinsyren udviste samme tendens som den intakte fytinsyre (tabel 4).

Gasudvikling og pH-måling. Udvikling af kuldioxid fra foder, tyndtarmsindhold og fæces er vist i tabel 5. Fra et basalt niveau svarende til 11.5 mg karbonat pr g fodertørstof fandtes en progressiv stigning i gasproduktionen med tilsætningen af kalciumkarbonat. Tyndtarms- og fæcesprøver viste samme tendens, endog af forstærket karakter.

pH-målinger i foder og fæces viste signifikant forhøjede værdier med foderets øgede kalciumkarbonat niveauer (tabel 6). Den syremængde, der skulle til for at nedbringe pH og omdanne kalciumkarbonat, steg tilsvarende. Tyndtarmsprøverne udviste imidlertid et andet mønster, dvs. fulgte ikke progressivt foderets karbonatindhold, – sandsynligvis pga. sekrektioner af store elektrolytmængder i ileum.

Diskussion

Kontrol diætens fytinsyreindhold blev nedbrudt i relativt større grad end rapsdiætens fytinsyreindhold. Dette forhold kan skyldes, at kontrol diæten havde et naturligt indhold af plantefytaser, hvilket den varmebehandlede rapsskrå ikke havde. Andre undersøgelser med svin understøtter opfattelsen af at foderets indhold af fytaser er væsentligt for udnyttelsen af foderets fosforindhold. Pellettering af svinefoder ved for høje temperaturer har således vist sig at hæmme udnyttelsen af fosfor, sandsynligvis pga. denaturering af plantefytaserne.

Nærværende forsøg viser imidlertid, at omkring 40% af rapsfoderets fytinsyre hydrolyseres i mave- tyndtarmsregionen, selv om foderet ikke indeholder plantefytaser. Dette antyder, at enzymer i tarmvæggene (alkalisk fosfatase, evt. andre fosfataser eller specifikke fytaser) eller mikrobielle fytaser hydrolyserer fytinsyre i et ikke ubetydeligt omfang. Analyse af foderets totale fosforindhold og foderets fytinsyreindhold viser, at minimum 65% af foderets fosfor er bundet i fytinsyre, den resterende mængde fosfor er bundet i andre forbindelser. Under forudsætning af, at al ikke-fytin-fosfor er absorberet i mave-tyndtarmsregionen, må yderligere 0,9 g

Tabel 3. Indtag af inositol fosfater (IP-3, IP-4, IP-5, IP-6) ¹⁾, mmol/dag ²⁾

Diæt	IP-3	IP-4	IP-5	Σ IP-3-5	IP-6
Raps 1	0,02±0,04	0,45±0,05	2,99±0,34	3,47±0,32	28,54±1,65
Raps 2	0,09±0,15	0,48±0,17	2,81±0,49	3,37±0,16	27,63±1,23
Raps 3	spor	0,35±0,04	2,69±0,36	3,04±0,40	27,04±1,30
'Kontrol'	0,04±0,05	0,25±0,01	1,13±0,27	1,47±0,22	14,32±1,07

¹⁾ IP-3 til IP-6 inositol fosfater indeholdende 3 til 6 fosfatgrupper pr inositolring.

²⁾ Værdierne er middelværdi ± standard afvigelse (SD) for 3 eller 4 rationer

Tabel 4. Sammenligning mellem opsamlinger af inositol 6-fosfat (IP-6) og hydrolyseprodukter heraf (IP-5, IP-4, IP-3) analyseret på materiale fra enden af tyndtarmen (ileum) og i fæces, angivet i mmol/dag og som genfindingsprocent.

Materiale	Diæt	IP-6	IP-6 % genfindning	Σ IP-3 - IP-5	Σ IP-3 - IP-5 % genfindning
Ileum	Raps 1	15,58 ^a	54,9 ^a	2,08 ^a	60,5 ^a
..	Raps 2	17,95 ^a	64,6 ^a	2,36 ^a	69,6 ^a
..	Raps 3	14,79 ^a	54,9 ^a	2,01 ^a	66,7 ^a
Fæces	Raps 1	0,90 ^c	3,1 ^c	0,21 ^c	5,7 ^c
..	Raps 2	6,39 ^b	23,1 ^b	0,92 ^b	27,3 ^b
..	Raps 3	15,12 ^a	57,7 ^a	2,13 ^a	71,9 ^a
SE		2,53	9,2	0,27	8,6
Ileum	Kontrol	4,90 ^A	33,9 ^A	3,72 ^A	252,0 ^A
Fæces	Kontrol	3,89 ^A	28,0 ^A	2,02 ^A	145,0 ^A

SE er den statistiske tests spredning

Værdier i samme søjle med forskellig bogstavpåtegning er signifikant forskellige mellem diæterne og materialet, p<0.05.

Stigende mængder kalciumkarbonat påvirkede heller ikke nedbrydningsgraden af fytinsyrens hydrolyseprodukter, inositol 5,4,3-fosfaterne målt i tyndtarmsindholdet (tabel 4). Mængden af hydrolyseprodukter, fundet i tyndtarmsindholdet efter indtagelse af kontroldiæten var højere end den indtagne mængde, hvilket viser, at der er sket en begyndende nedbrydning af fytinsyre (inositol 6-fosfat) i mave-tyndtarmsregionen.

Inositol-fosfater i gødning. I gødningsprøverne steg genfindingsprocenten af inositol 6-fosfat med kalciumniveauet i foderet. Fytinsyrenedbrydningen var 97% i raps-

skrådiæten uden kalciumsupplement, 77% på laveste Ca-dosering og 42% på højeste Ca-dosering. Kontrolldiæten viste en fytinsyre-nedbrydning på 72%.

Hydrolyseprodukterne, inositol 5,4,3-fosfat, viste en øget genfindning med stigende kalciumdosering. Dyrene på kontroldiæten viste højere gødningsniveauer af nedbrydningsprodukterne end det daglige indtag.

Sammenligning mellem inositol-fosfat niveauer i tyndtarmsprøver og fæces. Mængden af inositol 6-fosfat fundet i fæces var signifikant lavere end mængden fundet i tyndtarmsindholdet efter indtagelse af raps-

Tabel 2. Analyseret indhold i forsøgsfoderet, g/kg foder

Diæt	Raps 1	Raps 2	Raps 3	'Kontrol'
Organisk stof	962,3	952,7	943,1	933,7
Aske	37,7	47,3	56,9	66,3
Kvælstof	26,3	26,0	25,6	29,5
Kalcium	3,2	7,2	11,0	13,3
Fosfor	6,1	6,0	6,1	7,2
Magnesium	1,9	1,9	1,9	1,5
Neutral Detergent Fiber, NDF	96	94	89	139
Acid Detergent Fiber, ADF	88	86	87	57

tarmen. Kanylerne var konstrueret således, at tarmindholdet kunne ledes enten gennem tyndtarmen eller til ekstern opsamling. Totale opsamlinger af tarmmateriale kunne således foretages, og analyser og beregninger af nedbrydning og absorption i mave- tyndtarmsregionen kunne derfor udføres uden anvendelse af markører i foderet. Dyrene var anbragt i opsamlingsbure under hele forsøget. Foderets sammensætning fremgår af tabel 1. For rapsdiæterne var eneste forskel dosering af henholdsvis 0, 9,2 og 18,5 g kalciumkarbonat pr kg til foderet. Natriumklorid blev tilsat alle diæter; alle øvrige mineraler inklusiv fosfor stammede fra det naturlige indhold i rapsskrå. Tre forsøgsdyr blev tildelt et mere traditionelt svinefoder, der blev suppleret med makro- og mikromineraler i henhold til gældende normer. Analyser for de fire diæter er vist i tabel 2.

I forsøget benyttedes kuldsøskende, der blev tilfældigt fordelt på de fire foderrationer, proceduren blev gentaget 4 gange, kuld fungerede således som statistiske blokke. Alle udtagninger fra tyndtarm, gødning og urin blev analyseret separat, og sammenvejet i de statistiske beregninger således, at ét dyr repræsenterede én gentagelse.

Dyrene blev fodret restriktivt, og ved forsøgets begyndelse udgjorde foderrationerne 1400 g/dag, stigende til 1600 g ved forsøgets afslutning (32 dage); vand tildeltes ad libitum.

Tarmindholdet blev opsamlet fra ileumka-

nylerne i perioder af 24 timers varighed, ialt tre gange, henholdsvis dag 15, 18 og 29 i forsøgsperioden. Gødning og urin (sidstnævnte via kateter) blev derimod opsamlet i 2 adskilte 5-dages perioder, dagene 8-13 og 22-27 i forsøgsperioden.

Inositol 6-fosfat (intakt fytinsyre) og inositol 5,4,3-fosfat (hydrolyseprodukter af inositol 6-fosfat) blev adskilt ved ionpair kromatografi (HPLC) og kvantificeret ved deres refraktive index.

Karbonater (f.eks. kalciumkarbonat, kridt) udvikler luftformig kuldioxid ved reaktion med stærke syrer. Gasudviklingen fra foder, tyndtarmsindhold og fæces blev målt i et manometer. 0,5 g materiale blev tilsat 5 ml 2 mol/l saltsyre, hvorefter gasudviklingen blev målt efter 3 minutter. Resultaterne udtryktes i ækvivalente mængder kalciumkarbonat pr g tørstof.

pH blev registreret i foder, tyndtarmsmateriale og fæces ved at 0,9 g materiale (tørstof) blev tilsat 20 ml destilleret vand og pH målt efter 60 min. Opslemningen blev titreret med 1 mol/l saltsyre til pH 0,6, hvorefter al kalciumkarbonat indholdet anses for at være fuldstændig omsat. Den forbrugte syremængde er således et udtryk for prøvens indhold af fri kalciumkarbonat.

Resultater

Foder. Forsøgsdyrenes daglige indtag af inositol-fosfater er vist i tabel 3. Rationerne indeholdende rapsskrå viste ingen fytaseaktivitet medens 65% af inositol-fosfaterne blev nedbrudt i kontroldiæten ved optimale betingelser (in vitro, 37°C, 16 timers inkubation, pH 4.5).

Inositol-fosfater i tyndtarmsindhold. Genfinding af inositol 6-fosfat var for rapsskrådiæterne 55-65% i tyndtarmsindholdet og for kontroldiæten 34%. Det vil sige, at henholdsvis 35-45% og 66% af inositol 6-fosfat blev nedbrudt i mave- tyndtarmsregionen. Tildeling af kalciumkarbonat til rapsskrådiæterne influerede ikke på nedbrydningsgraden (tabel 4).

fosfor/dag, der er absorberet samme sted, stamme fra fytinsyreforbindelser. Denne mængde svarer til ca. 20% af den totale fytinsyrefosfor mængde, hvilket er overensstemmende med nedbrydningen af inositol fosfaterne i mave- tyndtarmsregionen.

Mængden af hydrolyseprodukter (inositol 5-4-3 fosfater), der blev fundet i tyndtarmsprøverne efter indtag af kontroldiæten, var større end det oprindelige indhold i diæten. Dette tyder på en trinvis nedbrydning af inositol 6-fosfat i mave- tyndtarmsregionen. Prøverne fra rapsdiæterne viste en reduktion af inositol 5-4-3 fosfater på 30-40% ved passage fra mund til ileum; dvs. samme reduktion, som var gældende for intakt fytinsyre (35-45%). Disse forskelle i nedbrydningsmønstre tyder på, at forskellige enzymer eller mekanismer har været involveret i hydrolysen. Tidligere undersøgelser viser, at cerealie fyta- ser hydrolyserer inositol-fosfater på mere

trinvis facon, hvilket medfører ophobning af inositol 3-4-fosfater. Dette understøtter den konklusion, at plantefytaser i kontroldiæten har medvirket ved nedbrydningen. Rapsdiætens inositol-fosfater udviste ikke denne trinvis hydrolyse, hvilket tyder på, at den enzymaktivitet, der har ligget til grund, er af mere uspecifik karakter, dvs. en mere generel fosfatase.

Vi har tidligere vist (829. Meddelelse), at den stigende tilsætning af kalciumkarbonat førte til en øget absorption af kalcium, udregnet såvel relativt som i absolutte tal. En betydelig mængde kalcium passerer dog tarmsystemet uden at blive optaget. Nærværende undersøgelse tyder endvidere på, at en del af den kalciummængde, der passerer tarmsystemet, stadig forefindes som karbonat (kridt), selv om den anvendte kalciumkarbonat var af reneste kvalitet (analysevare) og lille partikelstørrelse (slemmet kridt).