

Videncenter for
Svineproduktion

FRIT VALIN OG TRYPTOFAN I MINERALSKE FODERBLANDINGER

MEDDELELSE NR. 997

Ved analyse af mineralske foderblandinger kan det forventes at genfinde mellem 80 og 100 % af det tilsatte tryptofan og valin.

INSTITUTION: VIDENCENTER FOR SVINEPRODUKTION, DEN RULLENDE AFPRØVNING

FORFATTER: DORTHE K. RASMUSSEN

UDGIVET: 25. MARTS 2014

Dyregruppe: Smågrise, slagtesvin, søer

Fagområde: Ernæring

Sammendrag

Konklusionen fra tidligere forsøg samt dette forsøg er, at man for tryptofan og valin kan forvente et underindhold på op til 20 % ved analyse af mineralske foderblandinger. Det skyldes en kombination af tab af aminosyrerne i processen fra produktion, neddeling og analyse samt tab i analysen. Derudover vil der altid vil være lidt variation i analyseresultater over tid. Det betyder, at hvis man analyserer mineralske foderblandinger, kan man forvente et tab af frit tryptofan og valin indenfor dette interval, som altså ikke skyldes, at aminosyrerne ikke er tilsat.

Der blev i dette forsøg genfundet alt det tilsatte valin, mens der for tryptofan blev genfundet mellem 93 og 100 % af det tilsatte. Det viser, at analysen til bestemmelse af frit valin finder det tilsatte, mens analysemetoden for tryptofan ikke altid kan finde det tilsatte tryptofan.

Tilsætning af tryptofan i henholdsvis pulveriseret og granuleret form til mineralske foderblandinger gav den samme genfindning. Der er derfor ikke noget, der tyder på, at de forskellige tryptofan-kilder opfører sig forskelligt i mineralske foderblandinger.

Analyse af frit tryptofan ved brug af 3 forskellige analysemetoder udover den normalt anvendte (modificeret) metode viste, at der generelt blev genfundet et statistisk sikkert lavere indhold af frit tryptofan i forhold til forventet uanset, hvilken analysemetode, der blev anvendt, og uanset indholdet af kridt, kridt/benzoesyre eller ej i den mineralske foderblanding. For frit valin blev der genfundet det forventede niveau uanset, om der var kridt i den mineralske foderblanding eller ej.

Der genfindes ofte mindre end forventet af de deklarerede frie aminosyrer ved analyser af indkøbte mineralske foderblandinger. Derfor blev det i et laboratorieforsøg undersøgt, om den nuværende analysemetode kan genfinde de tilsatte syntetiske aminosyrer, valin og tryptofan, når et fysisk tab er udelukket og om det spiller nogen rolle for genfindingen, om den tilsatte tryptofan-kilde er pulveriseret eller granuleret. Samtidig blev det undersøgt, om genfindingen af frit tryptofan og valin er afhængig af indholdet af kridt og benzoesyre i den mineralske foderblanding og om genfindingen af frit tryptofan er afhængig af den anvendte analysemetode.

Baggrund

En indsamling af mineralske foderblandinger hos svineproducenter på Sjælland foretaget af Videncenter for Svineproduktion (VSP) i 2006 viste et underindhold af frie aminosyrer i forhold til det, der var deklareret [1].

I mange år har man forsøgt at finde grunden til afvigelserne. Der har specielt været fokuseret på afblanding og neddelingsmetoder, men på trods af optimering af disse faktorer, genfindes der alligevel ofte mindre end forventet af de deklarerede frie aminosyrer ved analyser af indkøbte mineralske foderblandinger [1], [2].

I et forsøg blev de mineralske foderblandinger produceret på småskalaniveau således, at afvejning af komponenter samt neddeling af prøver til analyse var optimeret for, at disse faktorer ikke skulle spille ind på analyseresultatet. Resultaterne viste, at de frie aminosyrer lysin, methionin og treonin blev genfundet 100 % i analysen, hvorimod tryptofan og valin kun kunne genfindes med ca. 80-90 % i forhold til forventet [3]. Det betød, at der blev mistet tryptofan og valin undervejs i processen – enten som et generelt tab i analysen eller som et fysisk tab undervejs fra blanding af de mineralske

foderblandinger til den endelige analyse. Både tryptofan og valin i blandingerne var et meget fint pulver og det var tydeligt, at der var pulver tilbage i blandingsbeholderne og rotationsneddeleren. Indholdet i det tilbageblevne pulver blev ikke analyseret, men ud fra resultaterne kunne det tyde på, at det primært bestod af tryptofan og valin.

Der er udviklet en ny type tryptofan, som er mere granuleret end tidligere (figur 1). Denne tryptofan-type skulle opføre sig anderledes sammenlignet med den nuværende tryptofan pga. af de granulerede partikler og det kan forventes, at brug af denne type tryptofan vil mindske risikoen for et fysisk tab. Frit tryptofan analyseres i samme analyse som de øvrige frie aminosyrer i modsætning til total tryptofan, der analyseres separat.



Figur 1. Billede af pulveriseret tryptofan (venstre) og granuleret tryptofan (højre).

Til analyse af frie aminosyrer anvendes en modificeret EØF-HPLC metode (EU 152/2009). I 2002 blev der i en ringanalyse foretaget af Plantedirektoratet (nu Fødevarestyrelsen), med deltagelse af alle danske laboratorier, fundet for lavt indhold af valin. Det viste sig, at der blev fundet for lidt valin, når det analyserede materiale indeholdt mineraler. Derefter blev metoden ændret, så prøver indeholdende mineraler blev forbehandlet med natriumsulfid, for at udfælde metalionerne, så de ikke forstyrrede analysen. Alle frie aminosyrer analyseres i dag med den modificerede metode på trods af, at det kun er konstateret nødvendigt for analysen af frit valin. Ved analyse af andre frie aminosyrer kan der anvendes en ikke-modificeret EØF-HPLC metode, hvor metalionerne ikke først udfældes med natriumsulfid. Det vides ikke, om ekstraktionen med natriumsulfid har betydning for genfindingen af de andre frie aminosyrer udover valin.

Efter ekstraktionen med natriumsulfid, gennemføres der en ekstraktion med 0,1 M HCl og pH indstilles til 2,2. Mineralske foderblandinger indeholder i gennemsnit ca. 30 % foderkridt som bærestof. Foderkridt kan reagere kemisk med saltsyre ($2\text{HCl} + \text{CaCO}_3 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{CaCl}_2$). Det er derfor

muligt, at der ved et højt indhold af foderkridt i mineralske foderblandinger, vil være et underskud af syre under ekstraktionen med HCl, idet det også bruges under den kemiske reaktion med foderkridt. Derved bliver al den frie tryptofan i blandingen muligvis ikke fundet. Derfor er det muligt, at der for mineralske foderblandinger med højt indhold af kridt skal bruges en højere syrekonzentration til ekstraktion og at styrken af syre skal afstemmes med mængden af kridt i blandingerne. Det er også muligt, at benzoesyre, som er en svag syre, kan påvirke analysemetoden til analyse af frie aminosyrer. På den anden side er tryptofan specielt under stærkt sure forhold mindre stabilt end de andre aminosyrer og det er muligt, at der kan være et tab af tryptofan under sure forhold. Det er derfor muligt, at frit tryptofan bør analyseres separat fra de andre aminosyrer med indstilling til en højere pH end 2,2. Som det er i dag, bliver alle frie aminosyrer analyseret efter samme metode.

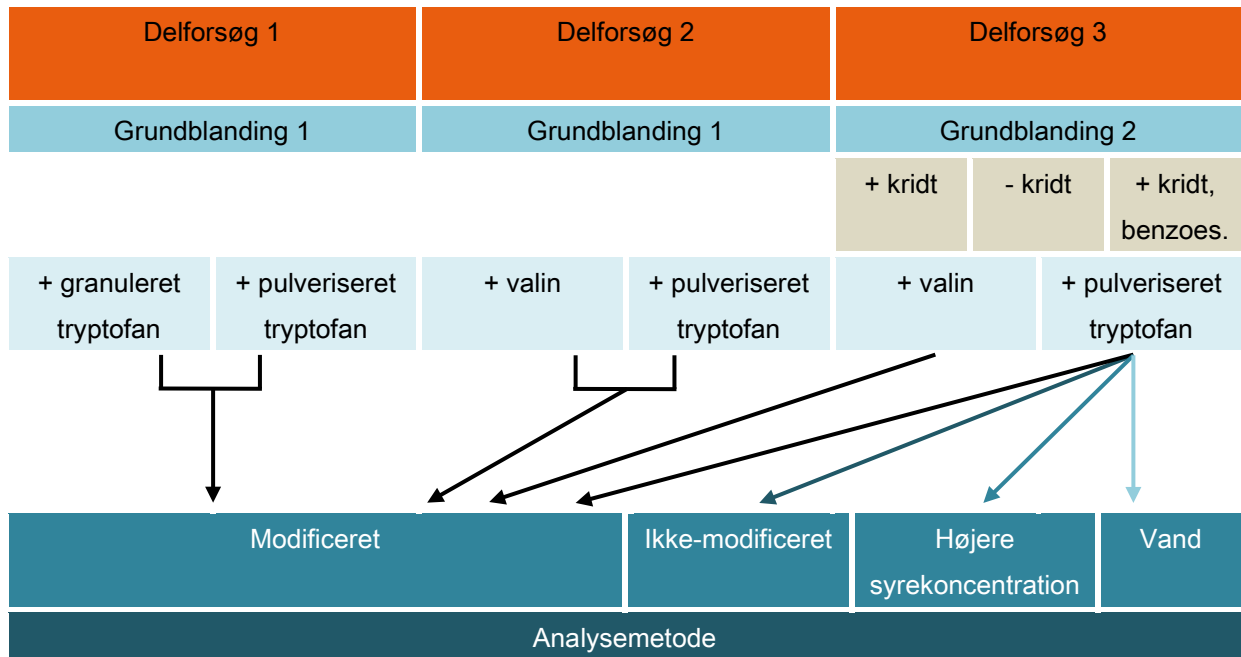
Formålet med projektet var at undersøge:

- om der ved brug af granuleret tryptofan sker et mindre fysisk tab af frit tryptofan end ved brug af pulveriseret tryptofan
- om der tabes frit tryptofan og valin i analysemetoden, når et fysisk tab af aminosyrerne er udelukket
- om genfindning af frit tryptofan og valin påvirkes af indholdet af kridt og benzoesyre i den mineralske foderblanding
- om tab af frit tryptofan i analysen kan hindres ved modificering af analysemetoden.

Materiale og metode

Forsøget bestod af 3 delforsøg (figur 2), hvor der blev brugt to forskellige grundblandinger (1 og 2) af mineralsk foder, som blev produceret hos Dansk Vilomix. De mineralske foderblandinger var for delforsøg 1 og 2 i en 1000 kg's bigbag og for delforsøg 3 i en 600 kg's bigbag, og der blev udtaget 1 kg's prøver efter TOS-principperne (Theory Of Sampling) [4]. Prøveudtagninger blev foretaget med et prøveudtagningsudstyr, hvor hele big-baggens indhold løb gennem en cross-cut sampler, som udtog små portioner af den mineralske foderblanding, mens den var i bevægelse fra en big-bag til en anden. Den anvendte mineralske foderblanding i delforsøg 1 og 2 (grundblanding 1) var en kommerciel blanding til smågrise uden tryptofan, valin og kridt. Denne blanding indeholdt benzoesyre. Indholdet i grundblanding 1 kan ses i appendiks 1. Den mineralske foderblanding til delforsøg 3 (grundblanding 2) var en kommerciel blanding til søer og var uden tryptofan, valin og kridt, men indeholdt i modsætning til blandingen i delforsøg 1 og 2 ikke benzoesyre. Grundblanding 2 til delforsøg 3 indeholdt samme komponenter som i et tidligere forsøg med analyse af frie aminosyrer i mineralske foderblandinger [3], og kan ses i appendiks 1. Forskellen mellem blandingerne var derfor primært indholdet af benzoesyre i den mineralske foderblanding til delforsøg 1 og 2. Alle resterende komponenter, som blev tilsat de mineralske foderblandinger, blev ligeledes leveret fra Dansk Vilomix.

De 3 delforsøg beskrives i detaljer i de næste afsnit og en oversigt kan derudover findes i figur 2.



Figur 2. Oversigt over delforsøg 1, 2 og 3 inkl. grundblandinger og analysemetoder.

Delforsøg 1: Genfindning af granuleret tryptofan i forhold til pulveriseret tryptofan

Formålet med forsøget var at undersøge, om der sker et mindre fysisk tab efter neddeling ved brug af en granuleret tryptofan i forhold til pulveriseret tryptofan.

Fra to 1 kg's prøver blev der afvejet to portioner à 788 gram af grundblanding 1 uden tryptofan og valin (appendiks 1). Hver portion blev tilsat 12 gram tryptofan henholdsvis pulveriseret eller granuleret:

- En blanding med 788 gram grundblanding 1 + 12 gram pulveriseret tryptofan (98 %)
- En blanding med 788 gram grundblanding 1 + 12 gram granuleret tryptofan (98 %)

Der var et forventet indhold af henholdsvis pulveriseret og granuleret tryptofan på 14,7 gram pr. kg i blandingerne.

Efter tilsætning af henholdsvis pulveriseret eller granuleret tryptofan, blev de to portioner à 800 gram blandet og neddelt på en rotationsneddeler til den anvendte prøvestørrelse på 3 gram og hele prøvemængden blev brugt til analyse af den frie aminosyre tryptofan.

Delforsøg 2: Tab af tryptofan og valin i analysemetoden

Formålet med forsøget var at undersøge, om der sker et tab af frit tryptofan og valin i analysen til bestemmelsen af de frie aminosyrer, når et fysisk tab i neddelingsprocessen er udelukket.

1 kg's prøve af grundblanding 1 uden tryptofan og valin (appendiks 1), som også blev brugt i delforsøg 1, blev neddelte på en rotationsneddeler til prøver på ca. 2,5 gram.

Derefter bestod forsøget af følgende blandinger:

- En blanding med 2,5 gram grundblanding 1 + 0,5 gram pulveriseret tryptofan (98 %)
- En blanding med 2,5 gram grundblanding 1 + 0,5 gram valin (96,5 %)

Der var et forventet indhold af pulveriseret tryptofan og valin på henholdsvis 172,3 gram pr. kg og 165,1 gram pr. kg i blandingerne.

De neddelte prøver á 2,5 gram mineralsk foder kom i amino-flasker, som normalt bruges til analyse af aminosyrer (figur 3) og derefter blev henholdsvis tryptofan og valin afvejet direkte i flaskerne. Hele prøvemængden blev brugt til analyse uden yderligere neddeling og blandingerne blev analyseret i amino-flaskerne, så der ikke kunne tabes materiale i processen. Alle 3 blandinger blev analyseret for frit tryptofan og valin.



Figur 3. Amino-flaske, som blandingerne blev afvejet og analyseret i.

Delforsøg 3: Genfindning af tryptofan og valin i mineralske foderblandinger +/- kridt og + kridt/benzoesyre

Formålet med forsøget var at undersøge, om genfindning af frit tryptofan og valin er afhængig af indholdet af kridt og benzoesyre i den analyserede mineralske foderblanding samt om tab af frit tryptofan i analysen kan hindres ved modificering af analysemetoden.

Der blev afvejet 6 blandinger i alt á 800 gram, hvoraf ca. 50 % af blandingerne bestod af grundblanding 2 (appendiks 1). De 6 blandinger havde samme niveau af mikromineraler, vitaminer,

aminosyrer, kridt osv. som i et tidligere forsøg med analyse af frie aminosyrer i mineralske foderblandinger [3]. Udover de testede aminosyrer, blev der til nogle af blandingerne tilsat kridt, benzoesyre, diamol og kartoffelstivelse. Blandingerne kan ses i tabel 1. Kartoffelstivelse blev valgt som erstatning for kridt idet bidraget af mineraler herfra er meget lavt. Der blev brugt den samme tryptofan-kilde og valin som i delforsøg 2.

Tabel 1. Blandinger brugt til forsøg.

Blanding	1	2	3	4	5	6
	<i>+ kridt</i>		<i>- kridt</i>		<i>+ kridt/benzoesyre</i>	
<i>Komponenter</i>	<i>Mængde, gram</i>					
Mineralsk grundfoderblanding	394	392	394	392	394	392
Diamol	24,27	24,15	24,27	24,15	-	-
Kartoffelstivelse	133,33	132,65	369,73	367,85	-	-
Kridt	236,4	235,2	-	-	236,4	235,2
Benzoesyre	-	-	-	-	157,6	156,8
Tryptofan, pulveriseret (98 %)	12	-	12	-	12	-
Valin (96,5 %)	-	16	-	16	-	16
I alt	800	800	800	800	800	800

De 6 blandinger blev analyseret for frit tryptofan og valin, hvor det var tilsat. Hver blanding blev neddelt på en rotationsneddeler til den anvendte prøvestørrelse på 3 gram og hele prøvemængden blev brugt til analyse af de frie aminosyrer valin og tryptofan.

Der var et forventet indhold af tryptofan og valin på henholdsvis 14,7 og 19,3 gram pr. kg i blandingerne.

Blandingerne med tilsat valin (blanding 2, 4 og 6), blev analyseret ved brug af den normalt anvendte metode (modificeret EØF-HPLC metode), som ligeledes blev benyttet i delforsøg 1 og 2 (med ekstraktion af metalioner inden analyse af frit valin).

Blandingerne med tilsat pulveriseret tryptofan (blanding 1, 3 og 5) blev analyseret ved brug af 4 forskellige metoder:

- 1) Modificeret EØF-HPLC metode: ekstraktion med natriumsulfid og derefter ekstraktion med 0,1 M HCl og indstilling af pH til 2,2
- 2) EØF-HPLC metode: ekstraktion med 0,1 M HCl og indstilling af pH til 2,2
- 3) EØF-HPLC metode + højere syrekonzentration: ekstraktion med 0,2 M HCl og indstilling af pH til 2,2 inden analyse
- 4) EØF-HPLC metode + vand: ekstraktion med vand og indstilling af pH til 3 inden analyse

Metode 1 blev, som tidligere nævnt, ligeledes brugt i delforsøg 1 og 2 – både til analyse af frit tryptofan og frit valin og anvendes normalt til analyse af frie aminosyrer. Frit valin i alle blandinger blev

udelukkende analyseret via metode 1. Metode 2, 3 og 4 blev alene anvendt til analyse af frit tryptofan. Metode 2 er en EØF-HPLC metode, hvor der ikke først ekstraheres med natriumsulfid. Metode 3 og 4 er variationer af metode 2. For metode 3 og 4 erstattes 0,1 M HCl af henholdsvis 0,2 M HCl eller vand.

Der blev for hver blanding med tilsat valin gennemført 9 analyser for frit valin over 3 perioder med 3 analyser i hver periode. For hver blanding med tilsat pulveriseret tryptofan, blev der udført 6 analyser for frit tryptofan over 2 perioder med 3 analyser i hver periode. For blanding 4 med valin, blev der dog udført 2 ekstra analyser med metode 1, modificeret metode, idet der her blev set en stor variation i de enkelte analyseresultater.

Generel beskrivelse af delforsøg 1, 2 og 3

Ud fra de mineralske grundfoderblandinger fra Dansk Vilomix, blev de testede mineralske foderblandinger afvejet og blandet hos Eurofins Steins. Efter afvejning af komponenterne i alle 3 delforsøg, blev de mineralske foderblandinger blandet natten over i en lukket beholder for at sikre, at blandingen blev homogen. Derefter blev der udtaget materiale til analyse efter TOS-principperne [4] ved at neddele til den anvendte prøvestørrelse på en rotationsneddeler.

Alle analyser blev udelukkende udført på ét laboratorium (Eurofins Steins), idet en tidligere undersøgelse af frie aminosyrer i mineralske foderblandinger viste rimelig overensstemmelse mellem Eurofins og et andet laboratorium [3]. Hver enkelt aminosyre i delforsøg 1 og 2 blev så vidt muligt analyseret samtidig. I delforsøg 3 blev analyserne for hver blanding og analysemetode gennemført over flere perioder (2-3) med gennemførelse af 3 analyser for hver blanding og metode pr. analysegang. De mineralske foderblandinger blev ikke formalet inden analyse, hvilket var standarden på laboratoriet. Metoden til analyse af frit tryptofan og valin i delforsøg 1 og 2 var den modificerede EØF-HPLC metode (EU 152/2009) beskrevet under "Baggrund". I delforsøg 3 blev der brugt den modificerede EØF-HPLC metode til analyse af frit tryptofan og valin samt 3 andre metoder til analyse af frit tryptofan. Alle afvejninger af komponenter blev i alle 3 delforsøg gennemført af den samme laborant, for at undgå personafhængig variation.

Der blev i hvert delforsøg udført mindst 6 analyser for frit tryptofan og frit valin for hver blanding. En tidligere undersøgelse har vist, at der for tryptofan og valin skal udføres 6 analyser pr. mineralisk foderblanding, for at finde et underindhold på op til 5 % i forhold til deklareret indhold [3]. De deklARATIONER, der blev brugt som referenceværdier, var det deklarerede indhold af frie aminosyrer og der blev ikke taget hensyn til indholdet af proteinbundne aminosyrer. Der blev ligeledes udført tre analyser på den rene tryptofan-kilde af den granulerede tryptofan. Den pulveriserede tryptofan og valin, som blev anvendt i forsøget, var blevet analyseret i et tidligere forsøg og disse tal blev brugt til sammenligning [3]. De anvendte indkøbte mineralske foderblandinger (grundblanding 1 og 2) blev analyseret for indhold af frit tryptofan og valin for at sikre, at de ikke indeholdt disse aminosyrer.

Statistik

Indhold af henholdsvis frit valin eller tryptofan i forhold til forventet blev i alle 3 delforsøg analyseret ved en proc MIXED i SAS. Delforsøg 1 og 2 blev analyseret samlet og i den statistiske model indgik delforsøg og aminosyre-type indenfor forsøg som systematisk effekt. For genfinding af frit valin i delforsøg 3 indgik indhold i den mineralske foderblanding (-kridt, + kridt, + kridt/benzoesyre) som systematisk effekt i den statistiske model. For genfinding af frit tryptofan indgik desuden analysemetode (modificeret, ikke-modificeret, højere syrekonzentration og vand) som systematisk effekt. For sammenligning af genfinding af frit valin afhængig af, om den mineralske foderblanding indeholdt kridt/benzoesyre eller ej, blev der foretaget Bonferroni-korrektion af signifikansniveauet (p-værdien) med 3 parvise sammenligninger. For sammenligning af genfinding af frit tryptofan afhængig analysemetode og indhold af kridt/benzoesyre eller ej i den mineralske foderblanding, blev der foretaget Bonferroni-korrektion af signifikansniveauet (p-værdien) med 3 parvise sammenligninger indenfor hver af de 4 analysemetoder. Resultaterne er vist som gennemsnit for hver gruppe. Statistisk sikre forskelle er angivet på mindst 5-procentniveau.

Resultater og diskussion

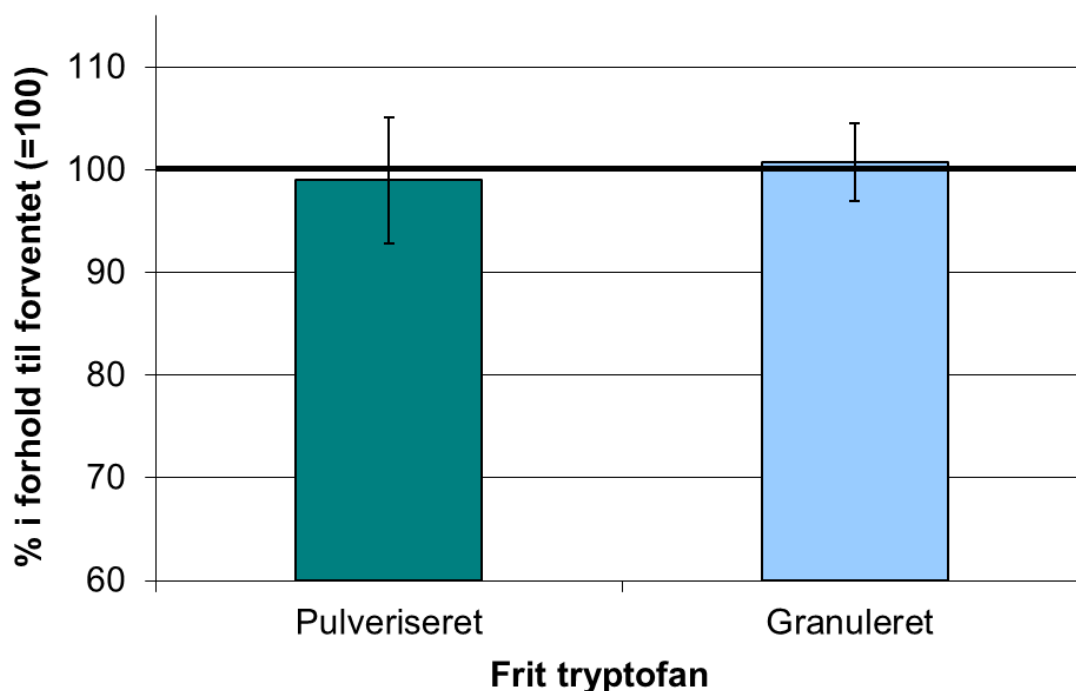
Analyser af de mineralske grundblandinger (1 og 2) i delforsøg 1, 2 og 3 viste, at der som forventet ikke var tilsat tryptofan eller valin (appendiks 3 og 5). Indholdet af aminosyrer i aminosyreråvarerne anvendt i delforsøg 1, 2 og 3 (granuleret tryptofan, pulveriseret tryptofan, valin) var ligeledes som forventet (appendiks 4).

Delforsøg 1: Genfinding af granuleret tryptofan i forhold til pulveriseret tryptofan

Som det ses af figur 4 og appendiks 2, svarede indholdet af frit tryptofan i grundblanding 1 tilsat pulveriseret eller granuleret tryptofan til det forventede. Der er derfor ikke noget, der tyder på, at de forskellige tryptofan-kilder opfører sig forskelligt i mineralske foderblandinger idet genfindingen var den samme for de to tryptofan-kilder.

Underindholdet på 20 % for pulveriseret tryptofan i mineralske foderblandinger, som blev set i en tidligere undersøgelse [3], blev ikke observeret her. Tryptofan blev i begge forsøg tilsat inden der blev foretaget neddeling af prøverne til analyse. Primær forskel var, at der ikke var kridt i den anvendte blanding i dette forsøg, hvorimod der var 29 % kridt i blandingen i det tidligere forsøg. Derudover var der til forskel tilsat benzoesyre, vegetabilsk olie og Ronozyme NP i blandingen i nærværende forsøg. Det vides ikke, om denne forskel kan have haft betydning, så tryptofan f.eks. i det tidligere forsøg kan have bundet sig til foderkridt, som er blevet siddende i rotationsneddeleren under neddeling af prøver til analyse. Dette blev ikke undersøgt nærmere. En anden mulighed er, at analysemetoden ikke kunne finde det tilsatte tryptofan ved højt indhold af foderkridt og/eller benzoesyre. Derfor blev der gennemført yderligere forsøg (delforsøg 3) for at undersøge, om indholdet af kridt og benzoesyre i

mineralske foderblandinger, havde en effekt på genfindingen af frit valin og tryptofan, og samtidig afprøve forskellige analysemetoder, som skulle tage hensyn til indholdet af kridt og benzoesyre.



Figur 4. Gennemsnitligt indhold af frit tryptofan i pulveriseret og granuleret form i forhold til forventet med 95 % konfidensinterval. Her er anvendt modificeret EØF-HPLC analysemetode.

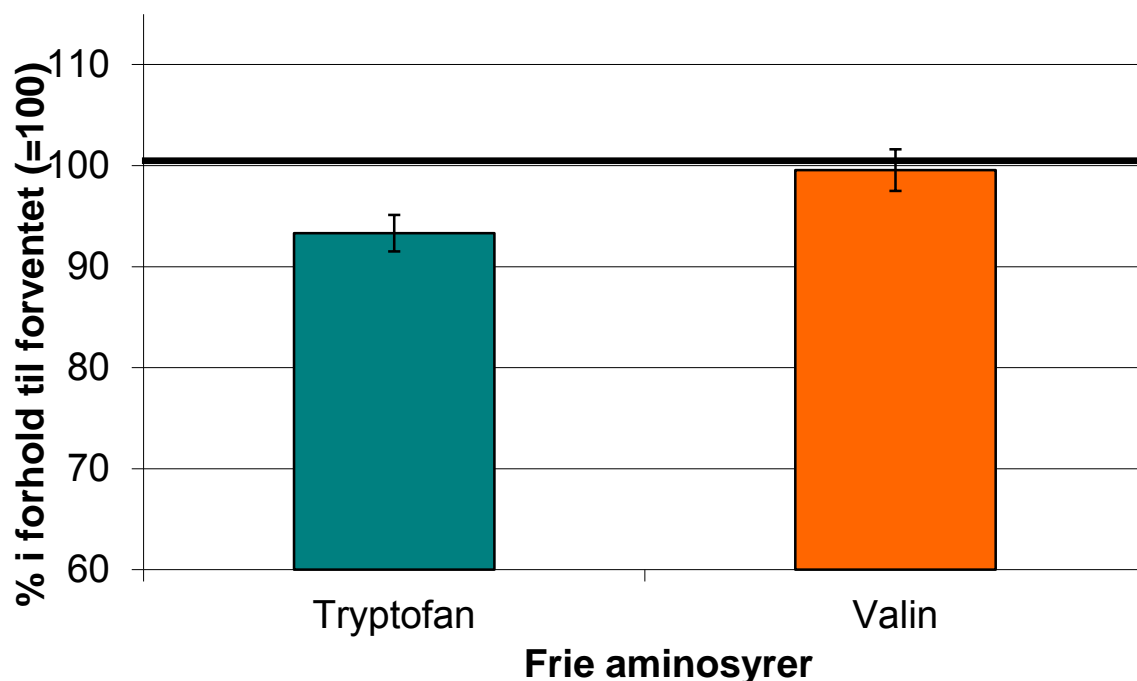
Delforsøg 2: Tab af tryptofan og valin i analysemetoden

Som det ses af figur 5 og appendiks 3 svarede indholdet af den frie aminosyre valin til det tilsatte, mens frit tryptofan statistisk sikkert var 7 % under det forventede niveau ($p < 0,001$).

De frie aminosyrer blev tilsat direkte i de amino-flasker, der blev brugt til analyse, lige før den endelige analyse for derved at undgå tab af materiale i selve neddelingsprocessen. Der er derfor ikke noget, der tyder på, at analysen til bestemmelse af frit valin ikke finder det tilsatte, og det underindhold på 10-15 %, der blev set i en tidligere undersøgelse, skyldes sandsynligvis et fysisk tab undervejs i processen fra blanding af de mineralske foderblandinger til den endelige analyse [3].

Tab af frit tryptofan i analysemetoden kan muligvis forklares med, at der i praksis ikke tilsættes så høje koncentrationer af aminosyrer i mineralske foderblandinger (0,5 gram tryptofan tilsat i 2,5 gram mineralisk foderblanding). I dette forsøg er tilsat ca. 10 gange mere tryptofan pr. kg end i en normal mineralisk foderblanding til smågrise. Ved høje koncentrationer skal der foretages flere fortyndinger i analysemetoden. Hver fortynding giver en øget usikkerhedsfaktor. Forsøget blev udført med en udvejet mængde på 0,5 gram, fordi det var den mindste mængde, der kunne udvejes med høj præcision. Dog vil afvejningsusikkerhed altid være større ved at afveje 0,5 gram i forhold til 12 gram.

For frit valin var der dog ikke noget tab i analysemetoden, så det er ligeledes muligt, at analysemetoden simpelthen ikke kan genfinde alt det tilsatte tryptofan.



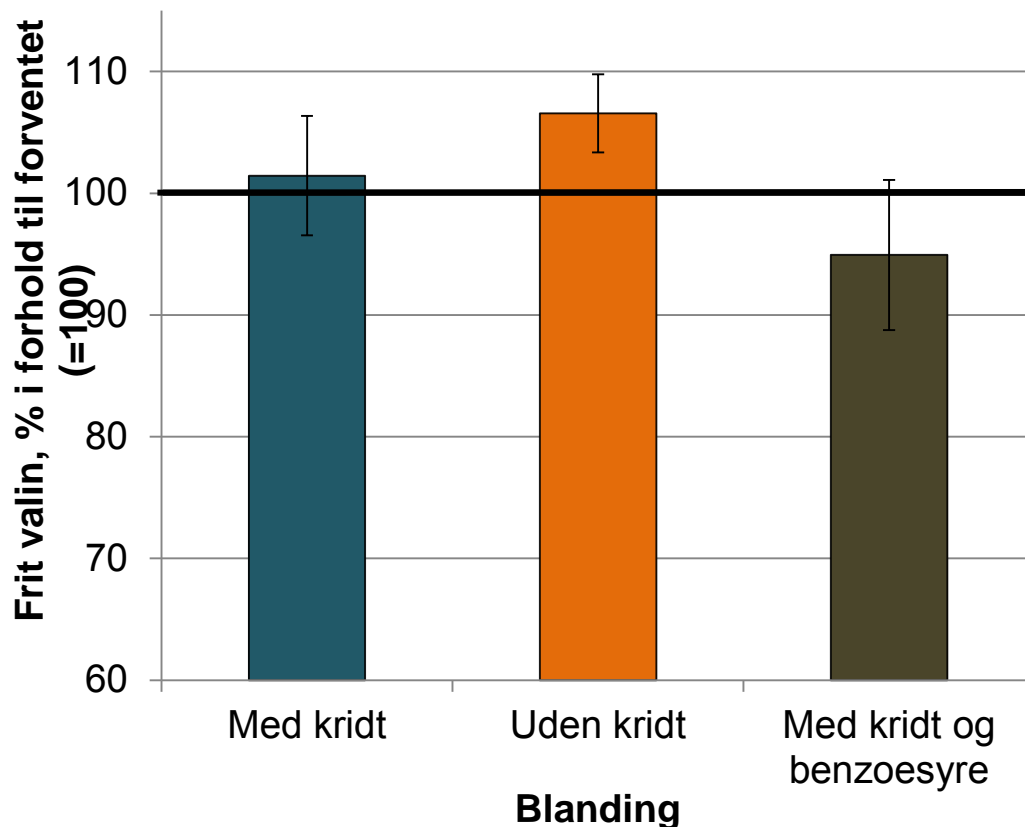
Figur 5. Gennemsnitligt indhold af frit tryptofan (pulveriseret) og valin i forhold til forventet med 95 % konfidensinterval. Her er anvendt modificeret EØF-HPLC analysemetode.

Delforsøg 3: Genfindning af tryptofan og valin i mineralske foderblandinger +/- kridt og + kridt/benzoesyre

For frit valin blev der genfundet det forventede eller højere niveau, uanset om blandingerne indeholdt kridt, kridt/benzoesyre eller ej (figur 6), hvilket ikke stemmer overens med resultater fra et tidligere forsøg, hvor der som tidligere nævnt blev genfundet mindre frit valin end forventet [3]. Grunden til dette kendes ikke og begge forsøg er gennemført ens mht. tilsætning af frit valin, neddeling osv. Sammenligning af resultater vil dog altid kunne påvirkes af eventuelle niveauforskelle over tid på laboratoriet.

Der blev genfundet lige meget frit valin, uanset om der var kridt i den mineralske foderblanding eller ej. Der blev dog genfundet statistisk sikkert mere frit valin, når blandingen var uden kridt i forhold til med kridt og benzoesyre ($p < 0,01$). Det kunne det tyde på, at den svage syre (benzoesyre) havde en negativ effekt på genfindingen af frit valin, når der ligeledes var kridt i blandingen.

Forskellen i genfindning af frit valin mellem de to blandinger har ingen praktisk betydning, idet både dette forsøg samt delforsøg 2 viser, at valin kan genfindes ved brug af den anvendte analysemetode.



Figur 6. Gennemsnitligt indhold af frit valin i forhold til forventet med 95 % konfidensinterval afhængig af, om den mineralske foderblanding indeholdt kridt eller ej, samt kridt og benzoesyre. Her er anvendt modificeret EØF-HPLC analysemetode.

Ved sammenligning af de forskellige analysemetoder, som blev testet til analyse af frit tryptofan, blev der uanset analysemetode og sammensætning af den mineralske foderblanding genfundet et statistisk sikkert lavere indhold af frit tryptofan end forventet (figur 7). Der var små numeriske og statistisk sikre forskelle i genfindingen af frit tryptofan mellem de forskellige analysemetoder afhængig af, om den mineralske foderblanding indeholdt kridt eller ej eller indeholdt kridt og benzoesyre. Dog havde forskellene i genfindning af frit tryptofan i de fleste tilfælde ingen biologisk relevans og der var heller ingen systematik i de fundne forskelle.

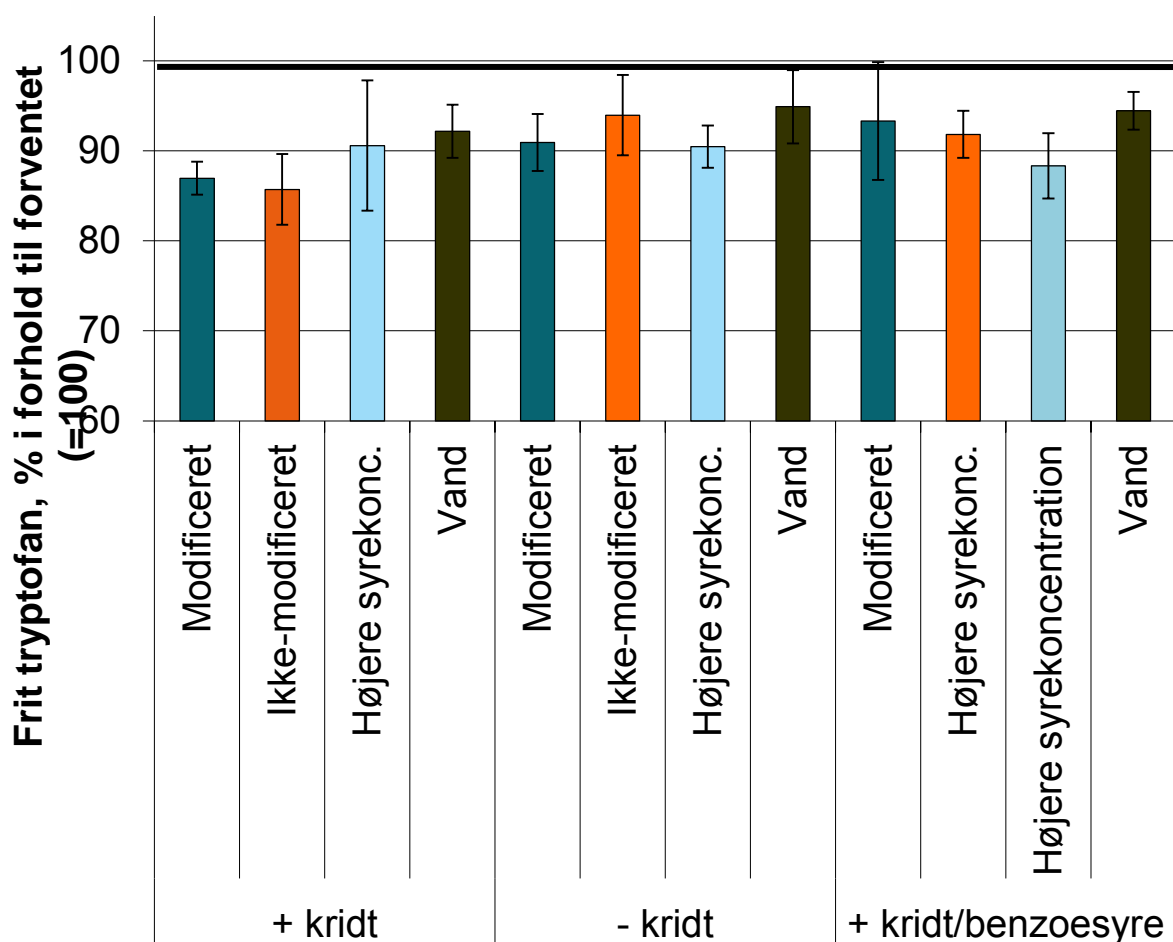
Det tyder ikke på, at der er en pH-afhængighed for analyse af frit tryptofan, idet der for alle analysemetoder var et underindhold af frit tryptofan og der ikke var et entydigt billede i resultaterne, som var afhængig af valg af analysemetode. Ligeledes tyder det på, at der generelt ikke skal tages specielle forholdsregler i analysen af frit tryptofan afhængig af indholdet af kridt i de mineralske foderblandinger samt evt. indhold af benzoesyre.

Dog viste delforsøget, at den numerisk laveste genfindning af frit tryptofan blev fundet i den mineralske foderblanding indeholdende kridt uden benzoesyre for alle analysemetoder med undtagelse af høj syrekonzentration. Analyse af frit tryptofan med modificeret metode viste, at der var en tendens til lavere genfindning af frit tryptofan i blandingen med kridt i forhold til uden ($p=0,09$), hvilket kunne tyde

på, at der pga. kridt i blandingen var et underskud af syre under ekstraktionen, som gjorde, at der blev fundet mindre frit tryptofan. Dog var genfindingen uanset indhold af kridt eller ej under det forventede.

Benzoesyre i den mineralske foderblanding sammen med kridt gjorde, at der blev genfundet 93 % af det forventede frie tryptofan ved brug af modificeret metode, hvilket var det numerisk højeste niveau indenfor denne metode. Dog var variationen for resultaterne størst for denne blanding og det er ikke muligt at sige, om den svage syre kan have haft en positiv effekt på analysemetode således, at der blev genfundet mere frit tryptofan.

Ved ekstraktionen af frit tryptofan med vand blev der uanset sammensætning af den mineralske foderblanding fundet den numerisk højeste genfinding af frit tryptofan. Det vides ikke, hvorfor dette var tilfældet.



Figur 7. Gennemsnitligt indhold af frit tryptofan i forhold til forventet med 95 % konfidensinterval afhængig af analysemetode (modificeret, ikke-modificeret, højere syrekonsentration, vand) og om den mineralske foderblanding indeholdt kridt eller ej, samt kridt og benzoesyre.

Der var for blandingen med kridt en mindre variation i analyseresultaterne for den modificerede metode, der normalt anvendes til analyse af frie aminosyrer på laboratoriet i forhold til de andre

metoder. For blandingen med kridt og benzoesyre, blev den største variation i analyseresultater set ved brug af modificeret metode (figur 7). Det var forventeligt, at variationen ville være mindst for den metode, der normalt udføres på laboratoriet, idet laboratoriet har stor øvelse og erfaring i at gennemføre denne. Det vides ikke, hvorfor variationen for blandingen med kridt og benzoesyre var større for den modificeret metode i forhold til de alternative metoder.

Generel diskussion

Ved analyse af frit tryptofan og valin i mineralske foderblandinger har tidligere forsøg samt dette forsøg vist, at der genfindes mellem 80 og 100 % af det tilsatte tryptofan og valin. Variationen kan skyldes tab af aminosyrerne i processen fra blanding til neddeling såvel som i selve analysemetoden. Det betyder, at hvis man analyserer mineralske foderblandinger, kan man forvente et niveau indenfor dette interval.

Samtidig kan resultaterne påvirkes af eventuelle niveauskred over tid på laboratoriet. Under analyserne i dette forsøg samt det tidligere, blev der ikke medtaget en referenceprøve med kendt værdi til at vise, om det kunne være en del af forklaringen på de forskelle, der blev set i dette og tidligere forsøg. Det kan have påvirket både den daværende og nuværende konklusion.

Konklusion

Konklusionen er, at der blev genfundet alt det tilsatte valin, mens der for tryptofan blev genfundet mellem 93 og 100 % af det tilsatte. Det viser, at analysen til bestemmelse af frit valin fandt det tilsatte, mens analysemetoden for tryptofan ikke altid kunne finde det tilsatte tryptofan.

I et tidligere forsøg blev der for frit tryptofan og valin fundet et underindhold på op til 20 % ved analyse af mineralske foderblandinger.

Den samlede konklusion er, at man ved analyse af mineralske foderblandinger kan forvente at genfinde mellem 80 og 100 % af det tilsatte tryptofan og valin. Det skyldes en kombination af tab af aminosyrerne i processen fra produktion til neddeling og analyse samt tab i analysen. Det betyder, at hvis man analyserer mineralske foderblandinger skal man forvente en genfinding af frit tryptofan og valin indenfor dette interval, som altså ikke skyldes, at aminosyrerne ikke er tilsat.

Tilsætning af tryptofan i henholdsvis pulveriseret og granuleret form til mineralske foderblandinger gav den samme genfinding uanset hvilken tryptofan-kilde, der blev brugt. Der er derfor ikke noget, der tyder på, at de forskellige tryptofan-kilder opfører sig forskelligt i mineralske foderblandinger. Analyse af frit tryptofan ved brug af 3 forskellige analysemetoder udover den normalt anvendte (modificeret) metode viste, at der generelt blev genfundet et lavere indhold af frit tryptofan i forhold til forventet, uanset hvilken analysemetode, der blev anvendt og uanset indholdet af kridt,

kridt/benzoesyre eller ej i den mineralske foderblanding. For frit valin blev der genfundet det forventede niveau, uanset om der var kridt i den mineralske foderblanding eller ej.

Referencer

- [1] Maribo, H.; Tybirk, P. (2007). Analyse af frie aminosyrer og fytase i mineralske foderblandinger. [Notat 0718, Landsudvalget for Svin.](#)
- [2] Kontrol af mineralsk foder. [Årsberetning 2008, Dansk Svineproduktion, s. 24.](#)
- [3] Rasmussen, D.K. (2011). Høj genfindning af frie aminosyrer i mineralske foderblandinger. [Meddelelse 905, Videncenter for Svineproduktion.](#)
- [4] Jørgensen, L.; Fisker, B. (2006). [Udtagning af foderprøver.](#) Viden, Videncenter for Svineproduktion.

Deltagere

Statistiker Mai Britt Friis Nielsen, Videncenter for Svineproduktion

Afprøvning nr. 1088

Aktivitetsnr.: 051-400870

//NJK//

Appendiks 1

Sammensætning af mineralske foderblandinger til delforsøg 1, 2 (grundblanding 1) og 3 (grundblanding 2).

Komponent	Grundblanding 1, %	Grundblanding 2, %
Monocalciumfosfat	25,8	39,46
Fodersalt	20,10	19,72
L-Lysin HCL, 98 %	12,46	20,00
DL-Methionin, 99 %	2,05	4,00
L-Treonin, 98 %	3,98	6,00
A Vitamin	0,03	0,06
D3 Vitamin	0,02	0,04
E Vitamin	0,53	1,96
K3 Vitamin	0,02	0,04
B1 Vitamin	0,01	0,02
B2 Vitamin	0,01	0,04
B6 Vitamin	0,01	0,02
B12 Vitamin	0,09	0,14
Ca D-pantothenat	0,04	0,08
Niacin	0,08	0,12
Biotin	0,01	0,06
Jern-II-sulfat	1,14	3,80
Kobber-II-sulfat	1,54	2,80
Manganoxid	0,28	0,50
Zinkoxid	0,57	1,00
Calcium iodat	0,03	0,05
Selen	0,03	0,07
Benzoesyre Vevovitall	21,32	-
Diamol	9,26	-
Vegetabilsk olie	0,50	-
Ronozyyme NP	0,09	-
Folinsyre	-	0,02

Appendiks 2

Blandingernes forventede og analyserede indhold af frit tryptofan i delforsøg 1. Analyserede værdier er angivet som gennemsnit for 6 analyser.

Blanding	Forventet, g/kg	Analyseret, g/kg
Grundblanding 1 + pulveriseret tryptofan	14,7	14,6
Grundblanding 1 + granuleret tryptofan	14,7	14,8

Appendiks 3

Blandingernes forventede og analyserede indhold af de frie aminosyrer, tryptofan og valin i delforsøg 2. Analyserede og forventede værdier er angivet som gennemsnit for 6 analyser.

Blandinger	Grundblanding 1		Grundblanding 1 + tryptofan		Grundblanding 1 + valin	
	Forventet, g/kg	Analyseret, g/kg	Forventet, g/kg	Analyseret, g/kg	Forventet, g/kg	Analyseret, g/kg
Aminosyre						
Tryptofan	0	0	172,3	160,7	-	
Valin	0	0	-	-	165,1	164,3

Appendiks 4

Aminosyre-råvarernes forventede og analyserede indhold af frie aminosyrer. Gennemsnit af 3 analyser.

Aminosyreråvare	Forventet, g/kg	Analyseret, g/kg
Pulveriseret tryptofan	980	1003
Granuleret tryptofan	980	968
Valin	965	975

Appendiks 5

Grundblanding 2's forventede og analyserede indhold af de frie aminosyrer, tryptofan og valin i delforsøg 3. Analyserede og forventede værdier er angivet som gennemsnit for 9 analyser (3 analyser pr. grundblanding 1, 3 og 5).

Blanding	Grundblanding 2	
	Forventet, g/kg	Analyseret, g/kg
Fri aminosyre		
Tryptofan	0	0,1
Valin	0	0,8

VIDENCENTER FOR SVINEPRODUKTION

Tlf.: 33 39 40 00

Fax: 33 11 25 45

vsp-info@lf.dk



en del af

Landbrug & Fødevarer

Ophavsretten tilhører Videncenter for Svineproduktion. Informationerne fra denne hjemmeside må anvendes i anden sammenhæng med kildeangivelse.

Ansvar: Informationerne på denne side er af generel karakter og søger ikke at løse individuelle eller konkrete rådgivningsbehov.

Videncenter for Svineproduktion er således i intet tilfælde ansvarlig for tab, direkte såvel som indirekte, som brugere måtte lide ved at anvende de indlagte informationer.