

Schätzung des standardisiert praecaecal verdaulichen Rohproteins und der Aminosäuren mittels einer einfachen Labormethode

V. Schumacher, S. Kehraus, K.-H. Südekum
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1 Gesamtziel und Vorhaben

Das hier vorgestellte Projekt befasst sich mit einer einfachen Labormethode zur Schätzung des standardisiert praecaecal verdaulichen Rohproteins (spcvXP) und der Aminosäuren (spcvAS). Gesamtziel des Vorhabens ist, einen Beitrag zu einer adäquaten AS-Versorgung von Schweinen zu leisten und damit auch Leistung und Tiergesundheit zu unterstützen sowie Stickstoffüberschüsse, die belastend für das Tier und die Umwelt sind, zu vermeiden. Dies lässt sich durch eine präzise Proteinbewertung des Futters erreichen.

Die Proteinbewertung erfolgt nach GfE seit 2006 auf Basis des spcvXP. *In vivo* wird dieses bisher mit einer invasiven, das Tier belastenden Methode (Fistel am terminalen Ileum) bestimmt. *In vitro* wird das spcvXP häufig mit einer aufwändigen und bisher wenig etablierten enzymatischen Methode (Boisen und Fernandez, 1995) bestimmt. Daher soll eine schnelle Labormethode zur Schätzung des spcvXP beim Schwein entwickelt werden. Analog zur Rohproteinfraktionierung beim Wiederkäuer nach Licitra et al. (1996) wird anhand des Neutral-Detergenzien- (NDUXP) oder Säure-Detergenzien-unlöslichen Rohproteins (ADUXP) das spcvXP geschätzt. Basierend auf der Bestimmung von NDUXP bzw. ADUXP wird das ND-lösliche (NDLXP) oder AD-lösliche Rohprotein (ADLXP) berechnet und für die Ableitung von Schätzgleichungen genutzt.

2 Prinzip

Die Labormethode basiert auf dem Wissen, dass Schweine zu den Dickdarmfermentierern gehören, entsprechend sind NDUXP bzw. ADUXP im Dünndarm weitgehend unverdaulich. Hingegen steht dem Tier das NDLXP bzw. ADLXP im Dünndarm zur Verfügung, welches wie folgt berechnet werden kann:

$$\text{NDLXP} = \text{XP}_{\text{Futter}} - \text{NDUXP}$$

Gleiches gilt auch für ADLXP und entsprechende AS. Die hier beschriebene Vorgehensweise ähnelt derjenigen für die Proteinbewertung beim Pferd (GfE, 2014).

3 Material und Methoden

Von einer Arbeitsgruppe der Universität Hohenheim wurde ein einzigartiger Probenpool von über 80 Einzelfuttermitteln zur Verfügung gestellt, deren spcvXP und spcvAS bereits *in vivo* am Schwein bestimmt wurde. Daraus resultiert eine Minimierung methodischer Varianzen (*in vivo*, Laboranalyse) für die Ableitungen der Schätzgleichungen. Der Probenpool setzte sich zusammen aus 32 Getreiden (unterschiedlicher Art und Genetik), Rapsfuttermitteln (Rapskuchen, unbehandelte und thermisch behandelte Rapsextraktionsschrote), Sojaprodukten (Sojaextraktionsschrote, Sojakuchen, unbehandelte, extrudierte und thermisch behandelte Vollfettsojabohnen), Ackerbohnen (unterschiedliche Trypsininhibitoraktivitäten (TA) und Tannin-gehalte), Erbsen (unterschiedlicher TA), Lupinen und speziellen Proben (Weizenkleber, Fischmehle, Sojaproteinkonzentrate, Erbsen- und Sojaproteinisolat). Diesen Proben wurden nach bestimmten N-haltigen Verbindungen kategorisiert (Tab. 1), z. B. Maillard-Reaktionsprodukte oder/und Tannin-Proteinkomplexe, die im ADUXP erfasst werden. Daher wurde für Proteinquellen das ADUXP und für Getreide, welche z. B. nicht thermisch behandelt wurden, bei denen keine Maillardprodukte und auch keine Tannine zu erwarten sind, das NDUXP bestimmt.

Die Isolierung des NDUXP bzw. ADUXP erfolgte nach Licitra et al. (1996) und die N-Bestimmung im Rückstand nach Kjeldahl (VO (EG) 152/2009, Anhang III, C). Eine Schätzgleichung für spcvXP wurde anhand der kalkulierten NDLXP-Gehalte und den *in vivo* spcvXP abgeleitet. Eine ähnliche Vorgehensweise gilt auch für ADLXP bzw. AS. Die Bestimmung der AS-Gehalte in den ND- bzw. AD-Rückständen erfolgte mit HPLC (VO (EG) 152/2009, Anh. III, F, G).

Tab 1: Auswahlkriterien für NDUXP und ADUXP

	Literatur	NDUXP	ADUXP
Maillard-XP	Van Soest & Mason, 1991; Licitra et al., 1996	/	X
Tannin-XP	Van Soest, 1994	/	X
Isoelektrischer Punkt Protein	Morales et al., 2013; Csonka et al., 1926, 1927	X	X
Phytat-XP-Komplex	Morales et al., 2013	X	X
		Getreide	Proteinquelle

/ = nicht enthalten, **X** = enthalten

4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm R Studio (Version 2022). Zunächst wurde eine Rohdatenanalyse vorgenommen und daraufhin die Entscheidung für das lineare Modell getroffen. Das lineare Modell für die Regressionsanalyse lautet:

$$y = a x + b \quad \text{mit } y = \text{spcvXP}, x = \text{NDLXP}$$

Eine Schätzgleichung für das spcvXP wurde aus dem linearen Modell abgeleitet. Die beschriebene Regressionsanalyse und die daraus abgeleitete Schätzgleichung wurden für die Validierung verwendet. Gleiches gilt auch für ADLXP und AS. Um das geschätzte spcvXP für die Validierung zu erhalten, wurde aus den NDUXP-Gehalten aus der Referenz (Ref.) das NDLXP berechnet und in die Schätzgleichung eingesetzt. Das auf diese Weise geschätzte spcvXP und die in der Ref. angegebene Werte der *in vivo* spcvXP für die identischen Proben wurden dann zur Validierung in das lineare Modell eingesetzt.

5 Ergebnisse

Für alle Proben wurde das *in vivo* spcvXP aus der Ref. gegen die Werte für das NDLXP für Getreide und ADLXP für Proteinquellen aufgetragen (Abb. 1). Daraus ergibt sich die Schätzgleichung für alle Proben:

$y = 0,8640 x - 13,372$ **$R^2 = 0,962$** **[1]**
 mit $y =$ geschätztes spcvXP (g/kg TM), $x =$ NDLXP bzw. ADLXP (g/kg TM)

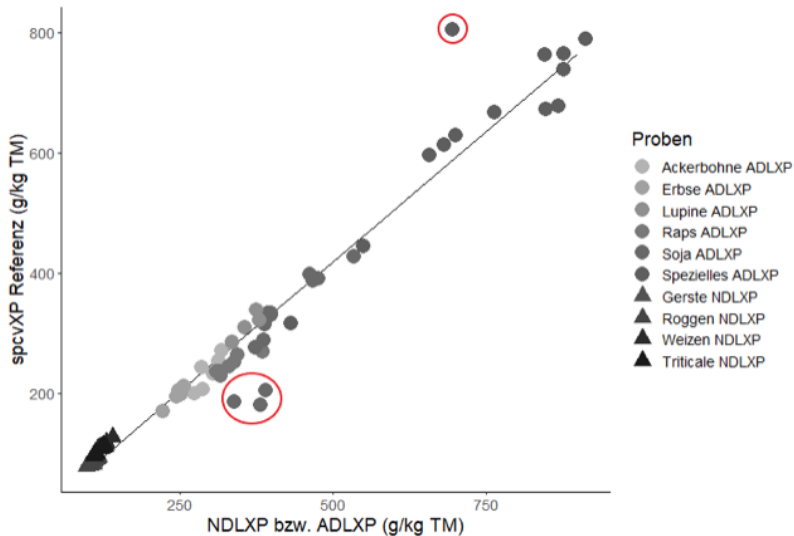


Abb. 1: Regression spcvXP für Getreide und Proteinquellen

Das Getreide befindet sich im unteren Bereich und die Proteinquellen im oberen Bereich der Abbildung 1, wobei drei Werte besonders auffallen. Hierbei handelt es sich um nicht ausreichend oder sehr wenig thermisch behandelte Vollfettsojabohnen ($TA > 7$ g/kg TM), die aufgrund der hohen TA so üblicherweise nicht in der Schweinefütterung eingesetzt werden. Ein weiterer auffälliger Wert ist bei einem von drei Weizenklebern zu erkennen. Dabei handelt es sich um einen hydrolysierten Weizenkleber, zu dem es zur Behandlung keine weiteren Angaben gab. Da ADLXP sehr niedrig war, also nach der Isolierung kaum Rückstand zur Analyse vorhanden war, ist der ADLXP Wert hoch. Die vier auffälligen Proben sind in der beschriebenen Regressionsanalyse mit aufgeführt und markiert. Nach Entfernung der vier auffälligen Proben erhöhte sich das Bestimmtheitsmaß auf $R^2 = 0,976$.

Für die Getreideproben wurde das *in vivo* spcvXP aus der Referenz gegen NDLXP aufgetragen (Abb. 2), wobei eine Gruppierung in Weizen+Triticale und Gerste+Roggen zu sehen ist.

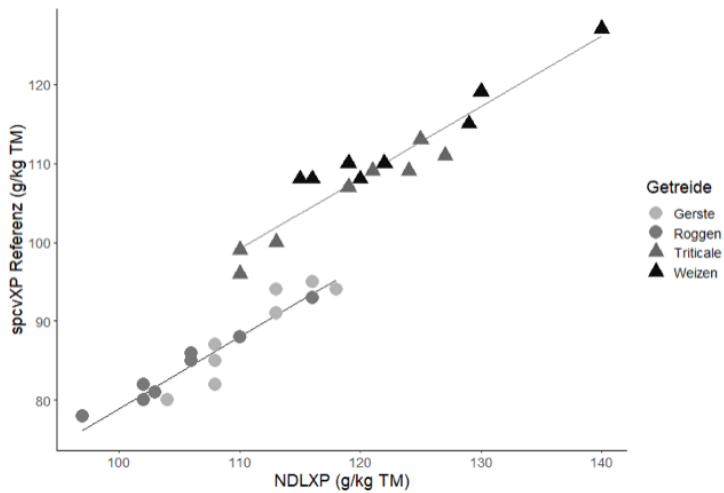


Abb. 2: Regression spcvXP für Weizen/Triticale und Gerste/Roggen

Daraus ergeben sich die Schätzgleichungen für Weizen/Triticale bzw. Roggen/Gerste:

Weizen/Triticale: $y = 0,8979 x + 0,438$ $R^2 = 0,908$ [2]
 y = geschätztes spcvXP (g/kg TM), x = NDLXP (g/kg TM)

Roggen/Gerste: $y = 0,9076 x - 11,826$ $R^2 = 0,896$ [3]
 y = geschätztes spcvXP (g/kg TM), x = NDLXP (g/kg TM)

In Abbildung 3 ist, exemplarisch für die AS, die Gruppierung der Getreide für Methionin (Met) zu beobachten.

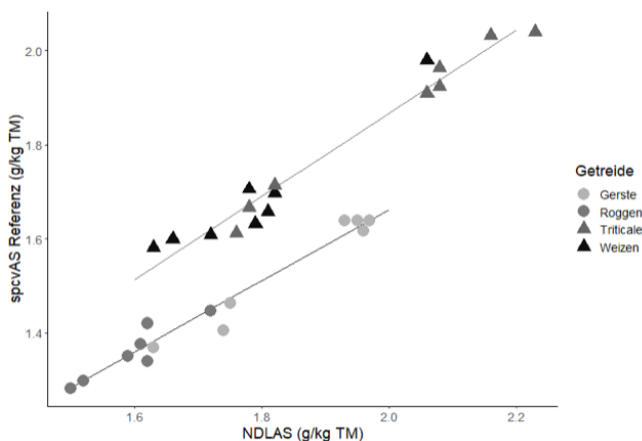


Abb. 3: Regression spcvMet für Weizen/Triticale und Gerste/Roggen

Daraus ergeben sich die Schätzgleichungen für Met für Weizen/Triticale bzw. Roggen/Gerste:

Weizen/Triticale: $y = 0,0951 x + 0,886$ $R^2 = 0,963$ [4]

y = geschätztes spcvMet (g/kg TM), x = NDLMet (g/kg TM)

Roggen/Gerste: $y = 0,1508 x + 0,755$ $R^2 = 0,957$ [5]

y = geschätztes spcvMet (g/kg TM), x = NDLMet (g/kg TM)

Das Bestimmtheitsmaß betrug beim Getreide für die Gruppierungen Weizen/Triticale und Roggen/Gerste für die bisher bestimmten AS (Lys, Met, Thr, Try, Arg, His, Iso, Leu, Phe) mit Ausnahme von Thr bei Weizen/Triticale und Lys bzw. Arg bei Roggen/Gerste über 0,9.

Abbildung 4 zeigt die Regression der Proteinquellen für Met. Hier werden 19 Proben dargestellt, Analysen weiterer Proben stehen noch aus. Daraus resultieren die Schätzgleichungen für Met für Proteinquellen:

$y = 0,8997 x - 0,086$ $R^2 = 0,999$ [6]

y = geschätztes spcvMet (g/kg TM), x = ADLAS (g/kg TM)

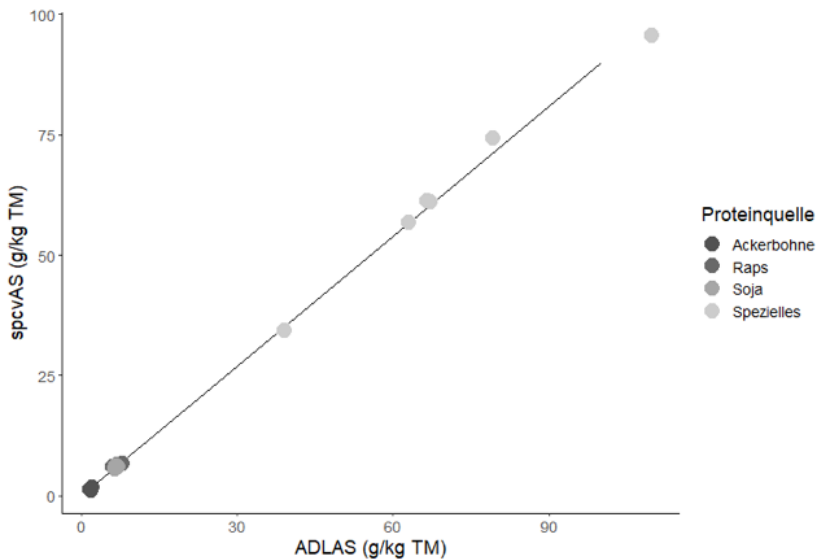


Abb. 4: Regression spcvMet für Proteinquellen

Für eine weitere essenzielle AS, das Lysin, zeigt sich in Proteinquellen ein ähnlich hohes Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,995$.

6 Validierung

Wie zuvor beschrieben wurden für die Validierung Daten aus der Ref. von Jondreville et al. (2000a, 2000b, 2001) und Leterme et al. (2000) herangezogen und die NDLXP-Gehalte in die Schätzgleichung für alle Proben (1) eingesetzt. Für die Validierung (Abb. 5) ergibt sich die Regressionsgleichung:

$$y = 0,9154 x + 9,555 \quad R^2 = 0,963 \quad [7]$$

$y =$ geschätztes spcvXP Ref. (g/kg TM), $x =$ *in vivo* spcvXP Ref. (g/kg TM)

Obwohl die Proben aus der Ref. sehr unterschiedlich sind und die NDUXP-Analysen in verschiedenen Laboren durchgeführt wurden, ist das Bestimmtheitsmaß der Validierung mit 0,963 sehr hoch.

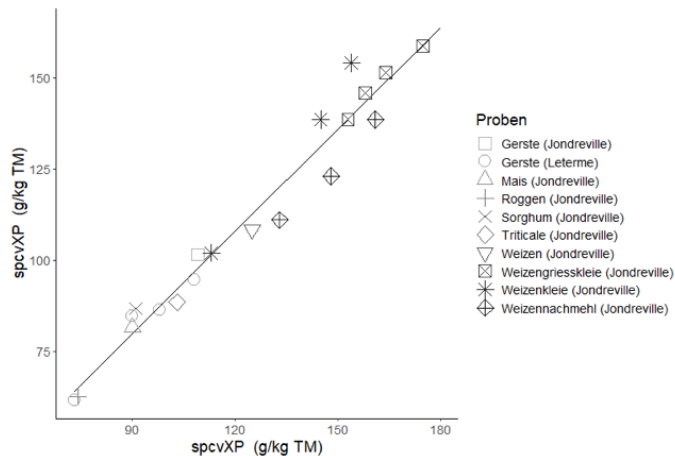


Abb. 5: Regression für die Validierung

Führt man die Validierung mit der Schätzgleichung ausschließlich für Getreide durch

$$y = 1,3236 x - 52,885 \quad R^2 = 0,884 \quad [8]$$

ergibt sich die folgende Regressionsgleichung für die Validierung:

$$y = 1,3393 x - 39,506 \quad R^2 = 0,963 \quad [9]$$

Das Bestimmtheitsmaß ist gegenüber der Validierung mit der Schätzgleichung für alle Proben (1) nicht höher

7 Fazit und Ausblick

Die Bestimmung von NDUXP und ADUXP ist eine Routineanalyse, die auch für die Proteinbewertung beim Wiederkäuer genutzt wird. Somit stellt die hier beschriebene schnelle Labormethode eine sehr gute Alternative zur *in vitro*-Enzym-Methode zur Schätzung des spcvXP bzw. der spcvAS dar. Ringversuche im VDLUFA zeigen eine sehr gute Vergleichbarkeit der NDLXP-Werte zwischen den Laboren (relative Vergleichsstandardabweichung: 3 %).

Eine NIRS-Kalibration von ADUXP bzw. AS und NDUXP bzw. AS steht noch aus und ein weiteres Projekt für Geflügel ist geplant.

8 Literaturangaben

Boisen, S., Fernandez, J.A., 1995: Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by *in vitro* analyses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51, 29-43.

Csonka, F.A., Jones, B.D., 1927: Studies on glutelins: I. α - and β -glutelins of wheat (*Triticum vulgare*). *J. Biol. Chem.* 73, 321-329.

Csonka, F.A., Murphy, J.C., Jones, D.B., 1926: The iso-electric points of various proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 48, 763-768.

GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie), 2006: Empfehlung zur Energie- und Nährstoffversorgung bei Schweinen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie), 2014: Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

Jondreville, C., van den Broecke, J., Grosjean, F., Van Cauwenberghe, S., Gâtel, F., 2000a: Ileal digestibility of amino acids in maize gluten feed for pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 9, 99-111.

Jondreville, C., van den Broecke, J., Grosjean, F., Van Cauwenberghe, S., Gâtel, F., 2000b: Ileal true digestibility of amino acids in wheat milling by-products for pigs. *Ann. Zootech.* 49, 55-65.

Jondreville, C., van den Broecke, J., Gâtel, F., Grosjean, F., Van Cauwenberghe, S., Sève, B., 2001: Ileal digestibility of amino acids and estimates of endogenous amino acid losses in pig fed wheat, triticale, rye, barley, maize and sorghum. *Anim. Res.* 50, 119-134.

- Leterme, P., Souffrant, W.-B., Théwis, A., 2000: Effect of barley fibres and barley intake on the ileal endogenous nitrogen losses in piglets. *J. Cereal Sci.* 31, 229-239.
- Licitra, G., Hernandez, T.M., Van Soest, P.J., 1996: Standardization of procedures for nitrogen fraction of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57, 347-358.
- Morales, G.A., Saenz de Rodriganez, M., Márquez, L., Díaz, M., Moyano, F.J., 2013: Solubilisation of protein fractions induced by *Escherichia coli* phytase and its effects on *in vitro* fish digestion of plant proteins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 181, 54-64.
- Van Soest, P.J., Mason, V.C., 1991: The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32, 45-53.
- Van Soest, P.J., 1994: *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd. Ed.. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln (ABl. L 54 S. 1). Zuletzt geändert durch Art. 1 VO (EU) 2022/893 vom 7.6.2022.