

Test af alternativ metode til ekstraktion af fedt i grovfoder

Forfattere: Rudolf Thøgersen^a, Henrik Martinussen^a, Nicolaj Ingemann Nielsen^a, Niels Bastian Kristensen^b, Saman Lashkari^b og Søren Krogh Jensen^b

^a SEGES Innovation, ^b Aarhus Universitet

STØTTET AF

Mælkeafgiftsfonden

Sammendrag

En alternativ metode til ekstraktion af fedt i foder – HCl-Bligh & Dyer (Jensen, 2008) - er testet på 15 prøver af henholdsvis græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage. Prøverne er desuden analyseret efter den officielle EU-metode (EC 152/2009) hos to kommercielle laboratorier.

HCl-Bligh & Dyer metoden gav højere råfedt- og fedtsyrekoncentration i både græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage end EU-metoden EC 152/2009. Forskellen var størst for råfedt. Fedtsyresammensætningen var stort set ens for de to metoder.

Undersøgelsen tyder på, at EU-metoden underestimerer råfedt- og fedtsyrekoncentrationen i grovfoder i forhold til HCl-Bligh & Dyer. Der vil derfor blive arbejdet videre med HCl-Bligh & Dyer metoden med henblik på at opbygge NIR-kalibreringer til græs-/kløvergræsensilage, majs-/kolbemajsensilage og TMR/PMR.

Undersøgelsen er en del af projektet "Råfedt og fedtsyrer er ikke ét fedt", der er et samarbejdsprojekt mellem Aarhus Universitet og SEGES Innovation finansieret af Mælkeafgiftsfonden.

Introduktion

Grovfoder og andre foderkomponenter med et lavt indhold af fedt er hidtil blevet målt med den officielle EU-metode (EC 152/2009), som er basis for måling af fedtindholdet i handelsfoder og dermed i kraftfoder. EU-metoden er udviklet til bestemmelse af fedtindholdet i foderstoffer med et forholdsvis højt indhold af almindelige triglycerider. Derfor har metoden nogle ulemper i forhold til ekstraktion af forskellige fedt og fedtsyrer fra foderprøver med et lavt indhold af fedt, hvor en stor andel af fedtsyrerne er bundet i mere polære forbindelser (Jensen, 2008). F.eks. giver filtreringsprocessen risiko for, at kortkædede fedtsyrer og fosforlipider vaskes gennem filteret og dermed ikke opfanges i analysen. Desuden kan der ske en oxidation af flerumættede fedtsyrer under tørreprocessen, og endelig er der en risiko for, at polære fedtstoffer ikke ekstraheres med de relativt apolære opløsningsmidler som

petroleumsæter eller diætylæter, men kræver et mere polært opløsningsmiddel som kloroform for at blive ekstraheret. Dette gælder polære fedtstoffer som frie fedtsyrer og fosforlipider. EU-metoden er målrettet kraftfoderblandinger og de almindelige råvarer i kraftfoder, der normalt har et relativt højt fedtindhold og en høj fedtsyreandel af råfedt. Forskellen mellem ekstraktionsmetoderne har normalt kun lille betydning for kraftfodermidler. Grovfoder har derimod et relativt lavt indhold af råfedt og en lav fedtsyreandel af råfedt, og samtidig udgør fosforlipider, kortkædede fedtsyrer og flerumættede fedtsyrer en højere andel i grovfoder. Derfor er hypotesen at EU-metoden undervurderer indholdet af råfedt og fedtsyrer i grovfoder.

Analysemetoden baseret på Bligh and Dyer (1959) anvender kloroform som opløsningsmiddel, hvilket giver en effektiv ekstraktion af både triglycerider, frie fedtsyrer og fosforlipider (Jensen, 2008). Imidlertid er syrebehandling forud for ekstraktionen en effektiv behandling for at frigive calciumsæber, som er kendt fra Stoldt fedt metoden (Stoldt, 1952), der også benyttes i den officielle EU-metode. Derfor kombineres de to metoder, så syrebehandling med saltsyre (HCl) sker forud for ekstraktionen med Bligh & Dyer metoden (Jensen, 2008).

Den nye metode har endnu ikke være anvendt på grovfoder. Der blev derfor gennemført en pilotundersøgelse, hvor HCl-Bligh & Dyer metoden blev sammenlignet med EU-metoden for at afdække forskelle og sammenhænge mellem de to metoder. Det blev desuden testet, om der var forskelle i EU-metoden mellem kommercielle laboratorier. Metoderne blev testet både i forhold til koncentration af råfedt og totale fedtsyrer samt fedtsyresammensætning.

Materialer og metoder

Der blev udvalgt 15 prøver af henholdsvis græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage fra høståret 2023 indsendt af kunder til SEGES Kvægbrugets ForsøgsLaboratorium. Prøverne var neddelt til prøvestørrelse på ca. 300 gram og tørret i ca. 40 timer ved 60°C i ovn med luftcirkulation. Efter tørring blev prøverne tilbagevejet og formålet på Peppink 200CM mølle med 0,5 mm sold. De formalede prøver blev scannet med dobbeltpakning af kvarts-prøvekopper på Bruker MPA (Bruker, Ettlingen, Tyskland). Prøverne af græsensilage blev udvalgt efter variation i fordøjelighed, mens prøverne af majs-/kolbemajsensilage blev udvalgt efter variation i stivelsesindholdet for at få en passende variation i koncentrationen af råfedt og totale fedtsyrer.

Prøverne blev neddelt i tre delprøver, der blev analyseret for råfedt, totale fedtsyrer og fedtsyresammensætning efter HCl-Bligh & Dyer metoden hos Aarhus Universitet samt efter EU-metoden EC 152/2009 hos Eurofins Agro Testing Denmark A/S i Vejen, Danmark og AGROLAB LUFA GmbH i Kiel, Tyskland. AGROLAB analyserede dog ikke for totale fedtsyrer, men kun for råfedt og fedtsyresammensætning.

Resultater og diskussion

Tabel 1, 2 og 3 viser gennemsnit og standardafvigelse for råfedtkoncentration, fedtsyreandel af råfedt og fedtsyresammensætning i henholdsvis græs-/kløvergræsensilage, majsensilage og kolbemajsensilage for de to metoder fordelt på de tre laboratorier.

HCl-Bligh & Dyer metoden viser i gennemsnit ca. 50% højere koncentration af råfedt i græs-/kløvergræsensilage end EU-metoden hos Eurofins Agro og AGROLAB, der har helt ens gennemsnitlige råfedtkoncentration (Tabel 1). Med HCl-Bligh & Dyer metoden findes der ca. 20% højere fedtsyrekoncentration. Resultaterne for HCl-Bligh & Dyer metoden er på niveau med tabelværdierne i NorFor, mens resultaterne for EU-metoden er væsentligt lavere for både råfedt- og fedtsyrekoncentration. Der er god overensstemmelse i fedtsyresammensætningen mellem HCl-Bligh & Dyer metoden fra AU og EU-metoden fra AGROLAB, mens Eurofins målte lidt lavere indhold af de dominerende fedtsyrer.

TABEL 1. Råfedtkoncentration, fedtsyreandel af råfedt og fedtsyresammensætning i græs-/kløvergræs-ensilage bestemt ved ekstraktion med HCl-Bligh & Dyer eller EC 152/2009 på forskellige laboratorier.

Parameter	HCl-Bligh&Dyer		EC 152/2009				NorFor Tabelværdi
	AU		Eurofins Agro		AGROLAB		
Råfedt og fedtsyrer	Gns.	Std.	Gns.	Std.	Gns.	Std.	
Antal prøver	15		15		15		
Råfedt, g/kg tørstof	44,7	11,0	29,1	7,5	29,2	8,2	44
Fedtsyreandel, g/kg råfedt	363	55	459	39	-	-	390
Fedtsyrer, g/kg tørstof	16,2	4,8	13,4	4,1	-	-	17,2
Fedtsyresammensætning, g/100 g fedtsyrer							
Antal prøver	15		15		14 ¹		
Fedtsyrer < C12	0,0	0,1	0,5	2,0	0,0	0,1	0,0
Laurinsyre C12:0	0,2	0,0	0,2	0,4	0,2	0,1	0,0
Myristinsyre C14:0	0,6	0,2	0,5	0,2	0,6	0,5	0,0
Palmitinsyre C16:0	16,9	1,5	15,4	1,9	17,1	1,9	20,7
Stearinsyre C18:0	2,3	0,4	1,4	0,3	2,0	0,5	0,0
Oliesyre C18:1w9	2,1	0,6	2,0	0,6	2,5	0,7	0,0
Linolsyre C18:2w6	14,0	1,6	12,8	1,6	15,1	1,5	17,0
Linolensyre C18:3w3	53,7	4,4	48,7	4,6	54,6	5,2	53,6
C20:5w3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:6w3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
Andre fedtsyrer	10,1	1,3	18,3	2,3	8,0	1,5	8,7
Jodtal beregnet	176	9	156		176		175

¹ En manglende prøve pga. for lidt prøvemateriale.

Råfedtkoncentrationen i majsensilage (Tabel 2) er ca. 60% højere med HCl-Bligh & Dyer end gennemsnittet for Eurofins Agro og AGROLAB med EU-metoden, mens fedtsyrekoncentrationen kun er ca. 35% højere end EU-metoden fra Eurofins. Både råfedt- og fedtsyrekoncentrationen er væsentligt højere for HCl-Bligh & Dyer metoden end tabelværdierne i NorFor, mens resultaterne for EU-metoden kun er lidt højere end tabelværdierne. Der er god overensstemmelse i fedtsyresammensætningen mellem HCl-Bligh & Dyer metoden og EU-metoden fra AGROLAB, mens Eurofins målte lidt lavere indhold af de dominerende fedtsyrer.

Analyserne af en enkelt prøve af kolbemajsensilage (Tabel 3) viser ca. 30% højere råfedt- og fedtsyrekoncentration med HCl-Bligh & Dyer end med EU-metoden, mens fedtsyreandelen er ens for de to metoder. Fedtsyresammensætningen er meget ens for de to analysemetoder.

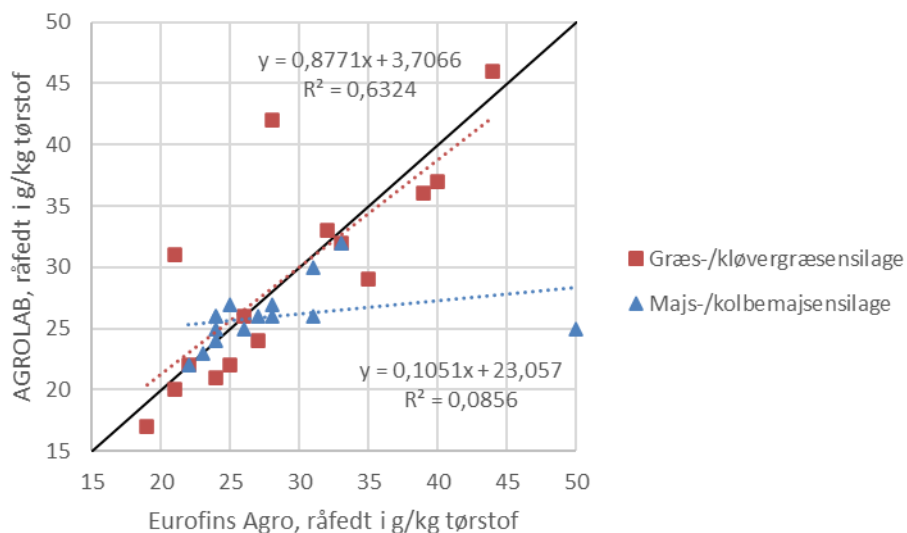
TABEL 2. Råfedtkoncentration, fedtsyreandel af råfedt og fedtsyresammensætning i majsensilage bestemt ved ekstraktion med HCl-Bligh & Dyer eller EC 152/2009 på forskellige laboratorier.

Parameter	HCl-Bligh&Dyer		EC 152/2009		Tabelværdi	
	AU		Eurofins Agro	AGROLAB	NorFor	
Råfedt og fedtsyrer	Gns.	Std.	Gns.	Std.	Gns.	Std.
Antal prøver	14		14		14	
Råfedt, g/kg tørstof	43,4	3,3	28,0	6,7	25,6	1,8
Fedtsyreandel, g/kg råfedt	515	72	583	49	-	-
Fedtsyrer, g/kg tørstof	22,2	2,8	16,3	3,6	-	-
Fedtsyresammensætning, g/100 g fedtsyrer						
Antal prøver	14		14		14	
Fedtsyrer < C12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Laurinsyre C12:0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0
Myristinsyre C14:0	0,3	0,1	0,5	0,2	0,3	0,1
Palmitinsyre C16:0	16,1	1,6	15,4	1,9	15,8	1,6
Stearinsyre C18:0	2,3	0,2	1,4	0,3	2,2	0,2
Oliesyre C18:1w9	19,0	1,3	18,0	1,1	19,8	1,3
Linolsyre C18:2w6	50,3	2,7	48,1	2,7	50,2	2,8
Linolensyre C18:3w3	7,5	1,9	7,0	1,7	7,1	1,8
C20:5w3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:6w3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Andre fedtsyrer	4,4	0,6	9,3	4,0	4,5	0,9
Jodtal beregnet	131	2	121		127	

TABEL 3. Råfedtkoncentration, fedtsyreandel af råfedt og fedtsyresammensætning i kolbemajsensilage bestemt ved ekstraktion med HCl-Bligh & Dyer eller EC 152/2009 på forskellige laboratorier.

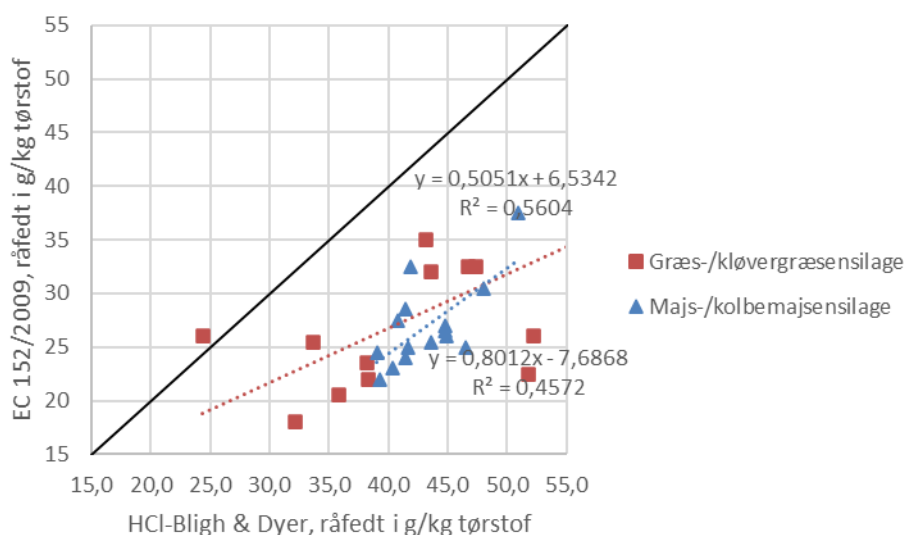
Parameter	HCl-Bligh&Dyer		EC 152/2009		Tabelværdi	
	AU		Eurofins Agro	AGROLAB	NorFor	
Råfedt og fedtsyrer	Gns.	Std.	Gns.	Std.	Gns.	Std.
Antal prøver	1		1		1	
Råfedt, g/kg tørstof	41,9		33,0		32,0	
Fedtsyreandel, g/kg råfedt	681		682		-	
Fedtsyrer, g/kg tørstof	28,5		22,5		-	
Fedtsyresammensætning, g/100 g fedtsyrer						
Antal prøver	1		1		1	
Fedtsyrer < C12	0,0		0,0		0,0	
Laurinsyre C12:0	0,0		0,0		0,0	
Myristinsyre C14:0	0,1		0,6		0,1	
Palmitinsyre C16:0	14,8		15,0		13,9	
Stearinsyre C18:0	2,1		1,7		2,0	
Oliesyre C18:1w9	18,8		18,2		19,6	
Linolsyre C18:2w6	59,4		57,6		59,9	
Linolensyre C18:3w3	1,8		1,7		1,7	
C20:5w3	0,0		0,0		0,0	
C22:6w3	0,0		0,0		0,0	
Andre fedtsyrer	3,0		5,4		2,8	
Jodtal beregnet	130		124		130	

Figur 1 viser sammenhængen for råfedtkoncentration i græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage mellem Eurofins Agro og AGROLAB for. Eurofins Agro og AGROLAB fandt i gennemsnit stort set ens råfedtkoncentration i både græs-/kløvergræsensilage, majsensilage og kolbemajsensilage, men som figur 1 viser, var der nogen variation mellem de to laboratorier.



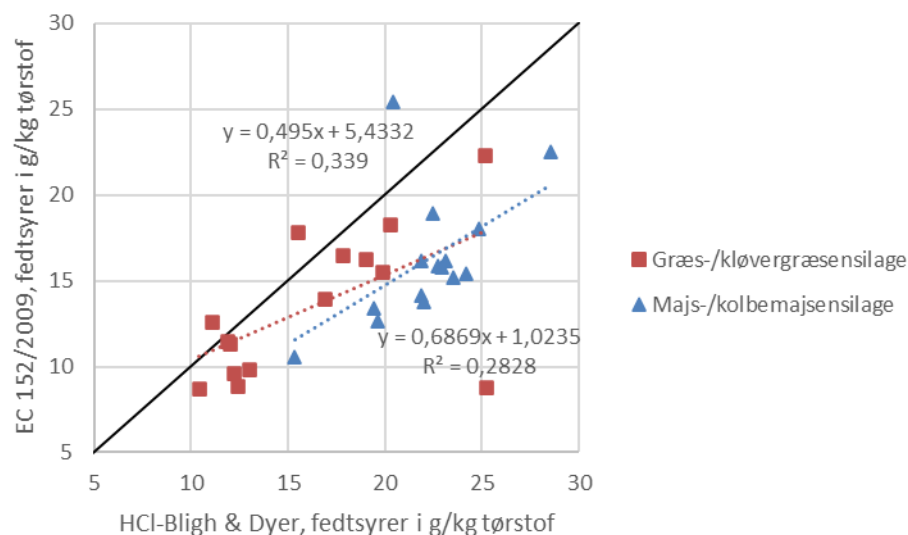
Figur 1. Sammenhæng for råfedtkoncentration i græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage mellem Eurofins Agro og AROLAB.

Figur 2 viser sammenhængen for råfedtkoncentration i græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage mellem HCI-Bligh & Dyer og EC 152/2009 (gennemsnit af Eurofins Agro og AGROLAB). Der er en markant højere råfedtkoncentration i både græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage med HCI-Bligh & Dyer metoden.



Figur 2. Sammenhæng for råfedtkoncentration i græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage mellem HCI-Bligh & Dyer og EC 152/2009 (gennemsnit af Eurofins Agro og AGROLAB).

Figur 3 viser sammenhængen for fedtsyrekoncentration i græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage mellem HCl-Bligh & Dyer og EC 152/2009 (Eurofins Agro). Her indgår ikke data fra AGROLAB, fordi der ikke er analyseret for fedtsyreandel. Der er ligesom for råfedt en højere fedtsyrekoncentration i både græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage med HCl-Bligh & Dyer metoden, men forskellen er mindre end for råfedt.



Figur 3. Sammenhæng for fedtsyrekoncentration i græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage mellem HCl-Bligh & Dyer og EC 152/2009 (Eurofins Agro)

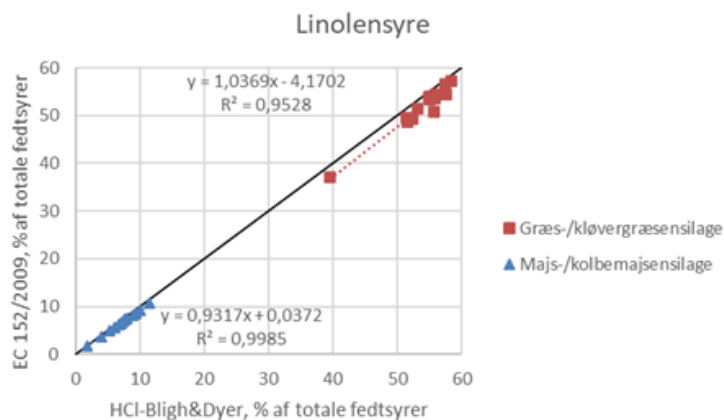
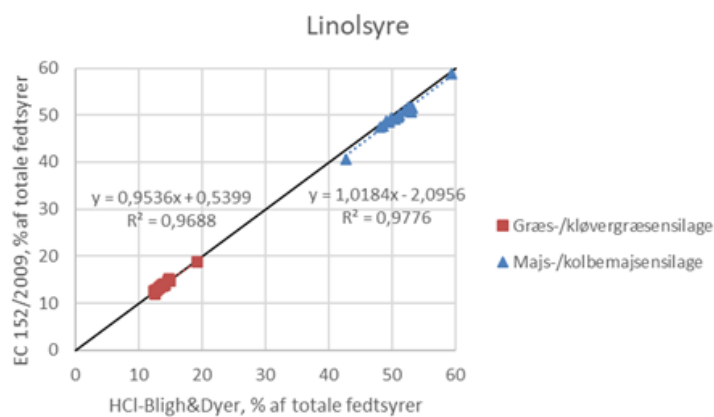
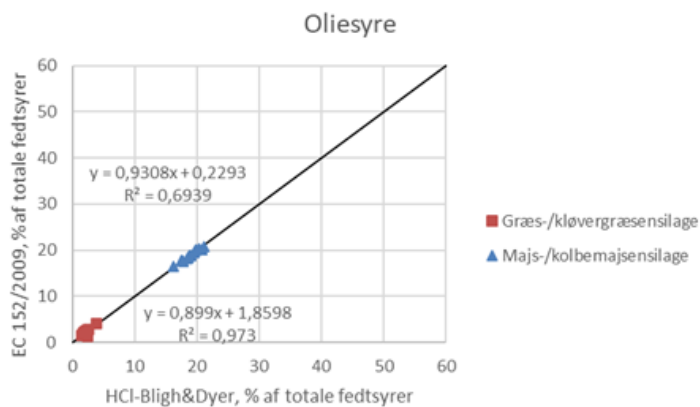
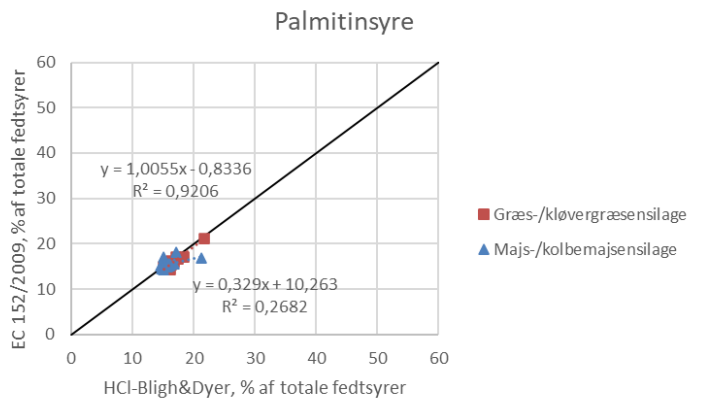
Figur 4 viser sammenhængen for andelen af palmitinsyre, oliesyre, linolsyre og linolensyre mellem HCl-Bligh & Dyer og EC 152/2009 (gennemsnit af Eurofins Agro og AGROLAB) i henholdsvis græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage. Der er generelt en god sammenhæng mellem de to metoder for alle fire fedtsyrer.

Resultaterne tyder på, at EU-metoden underestimerer råfedt- og fedtsyrekoncentrationen i grovfoder i forhold til HCl-Bligh & Dyer. Der vil derfor blive arbejdet med HCl-Bligh & Dyer metoden med henblik på at opbygge NIR-kalibreringer til græs-/kløvergræsensilage, majs-/kolbemajsensilage og TMR/PMR.

Konklusion

HCl-Bligh & Dyer metoden gav højere råfedt- og fedtsyrekoncentration i både græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemajsensilage end EU-metoden EC 152/2009. Forskellen var størst for råfedt. Fedtsyresammensætningen var stort set ens for de to metoder.

Undersøgelsen tyder på, at EU-metoden underestimerer råfedt- og fedtsyrekoncentrationen i grovfoder i forhold til HCl-Bligh & Dyer. Der vil derfor blive arbejdet videre med HCl-Bligh & Dyer metoden med henblik på at opbygge NIR-kalibreringer til græs-/kløvergræsensilage, majs-/kolbemajsensilage og TMR/PMR.



Figur 4. Sammenhæng for andelen af palmitinsyre, oliesyre, linolsyre og linolensyre i henholdsvis græs-/kløvergræsensilage og majs-/kolbemaajsensilage mellem HCl-Bligh & Dyer og EC 152/2009 (gennemsnit af Eurofins og AGROLAB).

Referencer

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol., 206- 207.

Jensen, S.K., 2008. Improved Bligh & Dyer extraction procedure. Lipid Technology, Vol. 20, No. 12.

Kommissionens forordning (EF) nr. 152/2009 om prøveudtagnings- og analysemetoder til offentlig kontrol af foder.

Stoldt, W. (1952) Vorschlag zur Vereinheitlichung der Fettbestimmung in Lebensmitteln. Fette, Seifen, Anstrichm., 54, 206–207.