

Aanpak van Antinutritieele Factoren in Veevoeding via Enzymen



Aan de hand van dierenproeven met gespeende biggen wordt het effect van prototype enzymen op antinutritieele factoren in veevoeding nagegaan. Hierbij wordt de vertering in het gastro-intestinaalkanaal onderzocht in aanwezigheid van deze prototype enzymen in vivo (en in vitro).

Student:
Drochmans Joke
Dierenzorg

Begeleidende docent:
Peggy Van Wiele
Mentor:
Bruggeman Geert

Woord vooraf

Dit verslag werd gemaakt voor één van de potentiële onderwerpen die ons werden ter keuze gesteld nl. proefdieren. De keuze om het onderwerp 'de aanpak van Antinutritionele Factoren in Veevoeding via Enzymen, toegepast aan de hand van dierenproeven', te bespreken in dit verslag is ter aanleiding van mijn interesse voor dit onderwerp, met name het aspect van de dierenproef en de verschillende methodes om de analyses uit te voeren in het labo. De stage werd uitgevoerd binnen NuScience in Drongen en de proefdierenfaciliteit in Melle. Deze keuze is de afgelopen maanden geen seconde meer uit mijn gedachtegang weg te denken. Ik heb het genoeg gehad om dit onderwerp zowel op theoretische als praktische manier te benaderen.

In eerste instantie wil ik mijn stagebegeleider/docent, Mevr. Peggy Van Wiele, bedanken, die mij het afgelopen semester met raad en daad heeft bijgestaan. Daarnaast zou ik aan mijn stagementor/directeur, Dhr. Geert Bruggeman, Jan Clement, Hannes Carmans en medewerkers een woord van dank willen richten. Niet alleen zorgden deze personen ervoor dat ik mijn stage tot een goed einde kon brengen, alsook deelden zij hun jarenlange kennis en ervaring, in verband met dit vak, met mij en zorgden voor een aangename sfeer in de groep.

Joke Drochmans
26 mei 2012

GEINTEGREERD EINDWERK

Titel

Aanpak van Antinutritionele Factoren in Veevoeding via Enzymen

Abstract

In de praktijk worden grondstoffen schaars en duur, wat ervoor zorgt dat de beschikbaarheid ervan niet altijd vanzelfsprekend is. Dit is de reden dat er wordt gezocht naar alternatieve grondstoffen. Deze zijn nutritioneel niet altijd even geschikt als voeder vanwege de aanwezigheid van antinutritionele factoren. Deze antinutritionele factoren kunnen wel met behulp van enzymen worden afgebroken. In voederconcepten van varkens zal de aanwezigheid van antinutritionele factoren worden nagegaan via toepassing van bepaalde specifieke (nieuwe) prototype enzymen. Deze evaluatie gebeurt in de vorm van dierenproeven met gespeende biggen (tot 20kg), waarbij de vertering in het gastro-intestinaalkanaal wordt onderzocht in aanwezigheid van deze prototype enzymen *in vivo* (en *in vitro* (= *ex vivo*)), voor ze verder worden uitgewerkt.

Het doel van deze stage is dus het bestuderen van (nieuwe) prototype enzymen en hun nevenactiviteiten in dieren als laatste (validerende) stap in de ontwikkeling van de enzymen ter inactivatie van antinutritionele factoren. Met deze enzymen kunnen dan enzymmengsels worden uitgewerkt die complexe voedersubstraten kunnen afbreken of beter verteerbaar maken (opwaarderen van grondstoffen), waardoor de opname van het voeder bij de dieren effectiever verloopt.

Er zal worden gewerkt volgens de reeds vooropgestelde protocols die in de praktijk worden gebruikt op het bedrijf. Deze zijn onder andere 'het spenen van de biggen' en 'enzymassays'.

Bij de dierenproef werd er verwacht dat voeder E de slechtste resultaten zou voortbrengen en voeder G de beste resultaten. Dit omdat dit het basisvoeder is zonder toevoegingen. De resultaten van de voeders F en H zouden er tussenin zitten. Uit de dierenproef lijken de resultaten van deze verwachtingen echter wat af te wijken.

De analyses die werden uitgevoerd voor dit basisvoeder zijn deze voor ruw eiwit, ruw vet, ruwe celstof, suiker, zetmeel en vocht. Bijna al de resultaten van de uitgevoerde analyses komen overeen met de normen die werden opgesteld voor dit basisvoeder.

De analyses die werden uitgevoerd op dit voeder zijn slechts enkele van de vele, maar het zijn wel de belangrijkste analyses. Omdat bijna al de resultaten overeen komen met de vooropgestelde normen is het voeder compatibel met de dierenproef waarvoor het voeder werd opgesteld.

Ziekte en weersomstandigheden kunnen de resultaten van deze proef beïnvloeden. Deze proef zal in de toekomst nog worden herhaald, maar voorlopig kan het effect van het gebruik van het enzym β -mannanase in veevoeding in twijfel getrokken worden als er wordt gekeken naar de dierenprestaties.

Trefwoorden

- Voederconcepten
- Enzymen
- Dierenproef
- Vertering
- Dierengezondheid

Inhoudsopgave

Voorblad	1
Woord vooraf	3
GEINTEGREERD EINDWERK	4
Titel	4
Abstract	4
Trefwoorden	5
Technische fiche stagebedrijf	VIII
1 Voorstelling van het bedrijf	9
1.1 Nutrition Sciences N.V.	9
1.1.1 Marktleider	9
1.1.2 Ambitie	9
1.1.3 Innovatie	10
1.1.4 Antibiotica vervanging	10
1.1.5 Wereldwijde activiteit	11
1.1.6 Agrifirm	11
2 Doelstelling	12
2.1 Eindwerkformulering	12
2.2 Probleemstelling	12
2.2.1 Rationale	13
2.2.2 Concept	13
2.2.3 Objectief	13
2.3 Vraag- en doelstelling	13
3 Inleiding/literatuurstudie	14
3.1 Reeds geweten: enzymen in veevoeding	14
3.2 Probleem in de praktijk	15
3.3 Noodzakelijke voorkennis	16
3.3.1 Analyse methodologie	16
3.3.2 Het varken als proefdier	16
3.3.2.1 Soort en behandeling	16
3.3.2.2 Hanteren en eenvoudige technieken	16
3.3.2.3 Huisvesting	17
3.3.3 Gastro-intestinaalkanaal van het varken	17
3.3.3.1 Mondholte	17
3.3.3.2 Maag	17
3.3.3.3 Dunne darm	18
3.3.3.4 Lever en gal	19
3.3.3.5 Pancreas – buikspeekselklier – alvleesklier	19
3.3.3.6 Dikke darm en blinde darm	19
3.3.4 Passagesnelheid doorheen het spijsverteringskanaal	19
3.3.5 Functie van de maagdarmflora	19
3.3.6 Voedereenheden	20
3.3.6.1 Energie	20
3.3.6.2 Eiwit	20
3.3.6.3 Vet	20
3.3.6.4 Ruwe celstof	21
3.3.6.5 Suiker	21
3.3.7 Werking enzym	21
3.3.7.1 Enzymstructuur	22
3.3.7.2 Enzymcofactoren	22
3.3.7.3 Werking van enzymen	22
3.3.7.4 Specificiteit van enzymen	23

3.3.7.5	Controlemechanisme voor enzymactiviteit	23
4	Materiaal en methode	25
4.1	Dierenproef: gespeende biggen	25
4.2	Bereiding enzym	30
4.3	Aanmaak voeder	32
4.4	Enzymassay: β -mannanase	33
4.5	Bepaling van het ruw vetgehalte	35
4.6	Bepaling van het ruwe celstofgehalte	37
4.7	Jodometrische suikerbepaling volgens Luff-Schoorl	39
4.8	Bepaling van het eiwitgehalte	41
4.9	Bepaling van het zetmeelgehalte	43
	Werkzaamheden niet in functie van je eindwerk	45
5	Resultaten	46
5.1	Dierenproef	46
5.1.1	Prestaties	46
5.1.2	Microbiologie	46
5.1.3	Sporen en mineralen	50
5.2	Enzymassay	51
5.3	Ruw vetgehalte	53
5.4	Gehalte aan ruwe celstof	53
5.5	Suikergehalte	53
5.6	Gehalte aan ruw eiwit	54
5.7	Vochtgehalte	54
5.8	Zetmeelgehalte	54
6	Discussie en algemeen besluit	55
7	Bio-ethische reflectie	57
7.1	Economisch standpunt	57
7.2	Ecologisch standpunt	57
7.3	Sociaal/maatschappelijk standpunt	57
8	Publiceerbaar artikel	58
	Persoonlijke visie op de stage en het stagebedrijf	
	Bijlagen	
	Lijst met gebruikte afkortingen	
	Lijst met figuren	
	Lijst met tabellen	
	Lijst met grafieken	
	Bronvermelding	

Technische fiche stagebedrijf

Naam stagebedrijf:	Nutrition Sciences N.V. (onderzoeksbedrijf binnen de NuScience groep)
Adres:	Booiebos 5
	9051 Drongen
Telefoonnummer:	+32 (0)9 280 29 30
GSM-nummer:	+32 (0)475 47 41 16
Faxnummer:	+32 (0)9 282 00 27
E-mail:	geert.bruggeman@vitamex.com
Directeur/diensthoofd:	Bruggeman Geert
Stagementor:	Bruggeman Geert
Sector:	Veevoeder, Landbouw
Afdeling/Groep binnen het stagebedrijf:	Nutrition Sciences N.V.
Aantal werknemers:	16
Omzet:	+ 1500000 €
Producten:	Zie bijlage 1
Specialisatie:	Zie bijlage 2
Twee relevante publicaties van het stagebedrijf:	<ul style="list-style-type: none"> - 'INTERVIEW: Nuscience Group to Benefit from Agrifirm-CehaveMergerOpportunities', internet, Vitamex, <u>Feedinfo</u>, 21/06/2011, (http://www.vitamex.com/vitamex/ewcm.nsf/0/0B16EAFB66FDE7C2C12578CE00519807/\$file/Nuscience%20group%20(Hersteld).pdf) - 'Press Releas:Vitamex Functional Feed Ingredients division appoints distributor for Central America', internet, Vitamex, 01/04/2011, (http://www.vitamex.com/vitamex/ewcm.nsf/0/9227C1886A9616D1C12578690046B1AF/\$file/Microsoft%20Word%20-%202011_press%20release%20FFI%20Chemsol.pdf)
Bijkomende gegevens:	N.V.T.

1 Voorstelling van het bedrijf

1.1 Nutrition Sciences N.V.

Er wordt volop onderzoek verricht naar het bevorderen van de prestaties en de gezondheid van dieren. Dat is de hoofdbezigheid van Nutrition Sciences N.V. Om dit te realiseren staat een gezonde voeding aan de basis van een veilige productie en reproductie van de dieren.¹²

Nutrition Sciences N.V. heeft zijn hoofdzetel in Drongen (België). Van hieruit worden hun producten – via de commerciële structuur NuScience - geëxporteerd naar meer dan 50 verschillende landen over de wereld. Deze producten zijn premixen, concentraten en specifieke voedingrediënten (FFI: functional feed ingredients) die bestemd zijn voor de veevoederindustrie.³

Nutrition Sciences N.V. richt zich vooral op het bevorderen van de gezondheid en het welzijn van de nutsdieren, maar daarnaast zijn ze ook bezig met het verbeteren van de prijstechnische prestaties van deze dieren.

Er wordt genoten van het vertrouwen van veevoederproducenten en landbouwbedrijven over de hele wereld, dit dankzij de exclusieve focus op gezonde dierenvoeding.

In de bespreking van het bedrijf komen ambitie, innovatie, antibioticavervanging en wereldwijde verspreiding aan bod.

1.1.1 Marktleider⁴

De NuScience groep, waarvan Nutrition Sciences N.V. deel uit maakt, heeft een aanbod aan producten die kunnen worden onderscheiden in drie productgroepen: natuurlijke functionele voedingrediënten (FFI: functional feed ingredients); deze verminderen het gebruik van antibiotica radicaal, concentraten; bestemd voor jonge en hoogproductieve dieren en premixen; bestemd voor de mengvoederindustrie.

Voor deze eerste groep van natuurlijke ingrediënten is Nutrition Sciences N.V. de innovator voor de NuScience groep, die een marktleider in dit segment kan genoemd worden. Dit is te danken aan de coherentie van nutritionele en technologische deskundigheid, doorgedreven onderzoek gestuurd door de noden van de markt, en de veiligheid van zijn productieproces.

1.1.2 Ambitie⁵

Omdat er nooit eerder zoveel belangstelling was voor de gezondheid en voedselveiligheid als nu stelt Nutrition Sciences N.V., die een topspeler is in de markt van veevoedingrediënten en premixen, verschillende doelen voorop.

Een eerste doel is het creëren van een economische en technische meerwaarde voor veevoederproducenten. Een tweede doel en belangrijke ambitie van het bedrijf is een bijdrage leveren aan de veiligheid van de voedselketen, de gezondheid van dieren samen

¹http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/0E3BA8B37274C73EC12572C20032013E?opendocument

²http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/14BC0F0CF1DEA5C0C1257625003673E7?opendocument

³http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/0E3BA8B37274C73EC12572C20032013E?opendocument

⁴http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/0E3BA8B37274C73EC12572C20032013E?opendocument

⁵http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/A60B61B82DB252D2C12576260028715C?opendocument

met het vertrouwen en het welzijn van de consument. Nutrition Sciences N.V. blijft daarenboven 'at the heart of feed'.

Kwaliteit en traceerbaarheid zijn fundamenteel wanneer het gaat om voedselveiligheid. De NuScience groep behaalde, met de hulp van Nutrition Sciences N.V., de kwaliteitslabels GMP, HACCP, Q&S, A-futter, GGO-gecontroleerde productie, antibioticavrij gecontroleerde productie en productie vrij van dierlijke eiwitten. De tracking- en tracingsystemen van het bedrijf zijn voor 100% onweerlegbaar. Het bedrijf voldoet aan de strikte algemene Europese wetgevingen ter productie van veevoeder (EC) No 183/2005.

1.1.3 Innovatie⁶

Innovatie is de voornaamste troef van Nutrition Sciences N.V. Er werden al diverse patenten behaald door vooruitstrevend fundamenteel onderzoek in het labo 'Nutrition Sciences N.V.' In samenwerking met toonaangevende laboratoria, universiteiten en onderzoeksinstituten in binnen- en buitenland wordt toegepast onderzoek uitgevoerd. Daarbij wordt er ook deelgenomen aan de Europese onderzoeksprogramma's.

Nutrition Sciences N.V. leeft het principe van "science to practical solution" na. Dit betekent dat nieuwe producten worden ontwikkeld met oog voor de fysiologie van het dier en vanuit de noden van de markt.

Voor de technische en diergeneeskundige ondersteuning is er altijd een team van bekwame professionals ter beschikking. Volgens specifieke behoeftes kunnen optimale mengsels berekend worden met de WinmixTM-software die voorhanden is. Ook kunnen de producten aangepast worden aan de lokale industriële situatie, na onderling overleg. De systemen zijn in staat de veranderende verwachtingen van een markt in constante evolutie te kunnen inlossen.

De praktische proefopstellingen en testen worden gerealiseerd in de proefdierfaciliteiten te Melle. Daar zijn er zowel varkens (128 dieren) als pluimvee (160 dieren) ter beschikking. De dierengezondheid wordt gemonitord door de veearts. Op deze dieren worden zoötechnische proeven alsook preferentieproeven uitgevoerd. Zo kunnen prototype enzymen en voederconcepten worden uitgetest. De werking van deze producten op het gastro-intestinaal kanaal wordt dan nader bekeken, na dissectie die wordt uitgevoerd volgens de FELASA principes. Wanneer een studie moet worden uitgevoerd dient hier een protocol voor opgesteld te worden. Dit protocol moet dan eerst worden voorgelegd aan een onafhankelijke ethische commissie die deze al dan niet goedkeurt.

1.1.4 Antibiotica vervanging⁷

Een gezond en veilig voederaanbod is waar Nutrition Sciences N.V. zich mee bezig houdt. Er wordt enorm veel aandacht besteed aan het verantwoord gebruik van geneesmiddelen wanneer deze worden ontwikkeld, dit vooral dan bij antibiotica.

Aromabiotic werd, op basis van natuurlijke ingrediënten die een effect hebben op de darmflora, door Nutrition Sciences N.V. ontwikkeld en was het eerste alternatief voor antibiotische groeibevorderaars.

⁶http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/8F468861D9596029C12576250038110D?opendocument

⁷http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/0E3BA8B37274C73EC12572C20032013E?opendocument

Aan de hand van proeven kon worden bewezen dat het antibioticaverbruik daalde door het gebruik van Aromabiotic op basis van middenlange ketenvetzuren (MLKV). Dit gegeven zorgt ervoor dat Nutrition Sciences de voorkeur krijgt in partnerschap met leidende veevoederproducenten in Europa.

1.1.5 Wereldwijde activiteit

De activiteiten van dit bedrijf zijn verspreid over meer dan 50 verschillende landen, verdeeld over heel de wereld. Daarnaast heeft Nutrition Sciences N.V. nog vestigingen in België, Nederland, Spanje, Polen, Hongarije, Oekraïne en China (zie onderstaande kaart; fig. 1).^{8,9}



Figuur 1: Vestigingen Nutrition Sciences

1.1.6 Agrifirm¹⁰

De Nederlandse veevoederproducent Agrifirm nam in 2005 via Cehave-Landbouwbelang een meerderheidsbelang in de NuScience groep. Hierdoor worden de producten op de markt geïntroduceerd, sneller dan voordien, samen met het uitvoeren van praktijkproeven om de producten nog verder te verfijnen.

⁸http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/14BC0F0CF1DEA5C0C1257625003673E7?opendocument

⁹http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/0E3BA8B37274C73EC12572C20032013E?opendocument

¹⁰http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/0E3BA8B37274C73EC12572C20032013E?opendocument

2 Doelstelling

2.1 Eindwerkformulering

In de praktijk is de beschikbaarheid van grondstoffen niet altijd even vanzelfsprekend. Deze worden namelijk schaars en duur. Daarom wordt er gezocht naar alternatieve grondstoffen om hierop over te gaan, maar deze zijn nutritioneel niet altijd geschikt als voeder, wegens de aanwezigheid van antinutritionele factoren. Daarom worden deze met enzymen afgebroken. In voederconcepten van varkens zullen de effecten van antinutritionele factoren worden nagegaan via de enzymwerking van bepaalde specifieke (nieuwe) prototype enzymen. Deze uitvoering gebeurt in de vorm van dierenproeven met gespeende biggen (tot 20 kg). Waarbij de vertering in het gastro-intestinaalkanaal wordt onderzocht in aanwezigheid van deze prototype enzymen en *in vivo* (en *in vitro* (= *ex vivo*)), voor ze verder worden uitgewerkt.

2.2 Probleemstelling

Omdat er in varkensvoeder diverse stoffen en planten worden gebruikt zal de exacte chemische samenstelling van het voeder niet altijd overeenstemmen met de eigenschappen van een goed verteerbaar voeder. Dus een voeder dat resulteert in verhoogde dierprestaties. Op basis van dagelijkse groei, voederopname en voederconversie (de hoeveelheid voeder dat een dier opneemt per kg groei) wordt de verteerbaarheid van het voeder berekend. Zo is er in varkensvoeder bijvoorbeeld tanine aanwezig. Tanine behoort tot de antinutritionele factoren en wordt gevonden in soja. Dit wil dus zeggen dat het een optimale verteerbaarheid in de weg staat. Men moet dus een manier vinden om de werking van deze antinutritionele factoren tot een minimum te beperken.

Doordat deze antinutritionele factoren aanwezig zijn in het voeder van de dieren kunnen zij hun voeder niet optimaal afbreken naar nutriënten die dan kunnen worden opgenomen in de bloedbaan. In plaats daarvan worden ze terug uitgescheiden met de feces. Zo gaat een groot deel aan nutriënten verloren, die anders hadden bijgedragen aan de ontwikkeling van het dier. Indien deze antinutritionele factoren niet aanwezig zouden zijn is het mogelijk dat er een verlaagde mestproductie optreedt bij het dier, maar in minder significante waarden, dit omdat de verteerbaarheid dan hoger ligt.

Onderstaand voorbeeld geeft een duidelijker beeld van het financieel kostenplaatje.

Gegeven:

- Stal 1: VCR = 1,5/varken versus stal 2: VCR = 1,6/varken
- Varken wordt 100 kg
- 150 varkens/stal

Berekening:

- Stal 1: $1,5 \times 100 = 150 \rightarrow 1$ varken = 150 kg voeder
 - o $150 \text{ kg} \times 150$ dieren = 22 500 kg voeder/stal
- Stal 2: $1,6 \times 100 = 160 \rightarrow 1$ varken = 160 kg voeder
 - o $160 \text{ kg} \times 150$ dieren = 24 000 kg voeder/stal
- A rato van 0,5 €/kg = 750 €

2.2.1 Rationale

Om moeilijk verteerbare stoffen in voeder (veevoeding) te kunnen verteren moeten deze eerst beter verteerbaar worden gemaakt. Dit kan gebeuren aan de hand van een technische behandeling, waarbij er wijzigingen gebeuren aan bv. de temperatuur of de pH van het voeder. Of het voeder ondergaat een behandeling waarbij er gebruik wordt gemaakt van enzymen.

2.2.2 Concept

Het is de bedoeling dat er enzymmengsels worden uitgewerkt die complexe voederstalen beter verteerbaar maken, waardoor de opname van het voeder bij de dieren effectiever verloopt.

2.2.3 Objectief

Er zullen dierenproeven worden ingepland en uitgevoerd ter controle van de inwerking van de voeders. Hiervan zullen de resultaten worden berekend en uitgewerkt. Deze resultaten worden bekomen door de uitvoering van enzymessays en de uitvoering van analyses voor de nutritionele samenstelling (eiwit, vet, ruwe celstof, suikers) van het voeder.

2.3 Vraag- en doelstelling

Vraagstelling: Hoe kunnen enzymen het effect van antinutritionele factoren verlagen ter verhoging van de verteerbaarheid?

Doelstelling: Het bestuderen van (nieuwe) prototype enzymen en hun nevenactiviteiten in dieren als laatste (validerende) stap in de ontwikkeling van de enzymen.

Er zal worden gewerkt volgens de reeds vooropgestelde protocols die in de praktijk worden gebruikt, op het bedrijf. Deze zijn onder andere 'het spenen van de biggen' en 'enzymassays'. Deze zullen verder worden besproken bij de methodiek.

In het protocol van 'gespeende biggen' wordt er weergegeven hoe en met wat de dieren worden gevoerd. Daarna kan dan naar de parameters worden gekeken om na te gaan wat het effect was van de bepaalde voeders. Ook worden er dissecties uitgevoerd van het gastro-intestinaal kanaal en labonderzoek van stalen die werden genomen tijdens de dissecties. Hier wordt dan microbiële analyse en biochemische analyse van gesteld samen met een uitvoering van enzymessays op meststalen.

De proeven die worden uitgevoerd op de dieren zijn het vervolg van eerder uitgevoerde proeven. Ook is er een vervolg voorzien na het uitvoeren van deze proeven.

3 Inleiding/literatuurstudie

3.1 Reeds geweten: enzymen in veevoeding¹¹

Men weet nu dat het toevoegen van enzymen aan voeder de algemene verteerbaarheid verhoogd, wat een positief resultaat kan geven bij jonge dieren zoals betere groeiprestaties.

Het is voornamelijk bij de levensprocessen dat enzymen een sleutelrol innemen. Indien omzettingen, zoals opsplitsing van zetmeel in suikers, zouden plaats vinden zonder tussenkomst van enzymen zouden deze reacties nauwelijks plaatsvinden in waterig milieu dat kenmerkend is voor alle levende organismen. Chemische reacties kunnen tot 10 miljoen keer versnellen door de aanwezigheid van enzymen. Hierdoor is er een gecontroleerde opvolging van chemische reacties mogelijk in biologische systemen. Na de katalyse reactie keren de enzymen terug naar hun oorspronkelijke staat, in plaat van te worden verbruikt. Dankzij dit proces is er slechts een geringe hoeveelheid enzym nodig in vergelijking met de hoeveelheid substraat.

Het gebruik van enzymen in veevoerders brengt verschillende voordelen met zich mee:

- Er worden specifieke verteringsproblemen voorkomen,
- de benutbaarheid en verteringsrendement van de voeders wordt verbeterd,
- grondstoffen kunnen flexibeler worden gebruikt,
- de technologische eigenschappen van het voeder worden verbeterd (bv. Verpompbaarheid bij bijvoeding),
- de totale voerkosten liggen lager.

Alle levende organismen (micro-organismen, planten en dieren) produceren enzymen en zijn in alle cellen en buiten de cellen aanwezig (bv. Maag-darmkanaal). De toegevoegde enzymen in voedingsstoffen worden in het verteringskanaal afgebroken op dezelfde manier als andere proteïnen. Dit is de reden waardoor er geen resten worden gevonden in de mest.

Er wordt vaak voor gekozen om een mengsel van verschillende enzymen te gebruiken in het voeder. Dit omdat een enzym zeer specifieke reacties katalyseren. Door een mengsel van enzymen te gebruiken kunnen meerdere verschillende (schadelijke) stoffen tegelijkertijd afgebroken worden.

Bij het gebruik van deze mengsels moet men er wel zeker van zijn dat deze enzymen allemaal reageren onder dezelfde omstandigheden. Wanneer dit van toepassing is dan zal het resultaat vaak beter zijn in vergelijking met indien er individuele enzymen worden gebruikt.

Het grootste deel van de commercieel belangrijke enzymen worden geproduceerd door micro-organismen (schimmels, gisten en bacteriën). Daarnaast wordt er ook gebruik gemaakt van enzympreparaten van dierlijke weefsels (lipasen en proteasen uit de pancreas) en planten (bv. Papaïne, een protease vervat in papajafruit) voor de toepassing van industriële enzymen.

Voederenzymen zijn het resultaat van vele jaren kostbaar onderzoek en ontwikkelingsprocessen. Door hun geleidelijk groeiend belang werden ze in 1993 opgenomen in Richtlijn 70/524/EEC voor additieven in diervoeding en zijn ze dus wettelijk gereguleerd voor gebruik binnen de Europese Unie. Volgende enzymen worden vaak gebruikt in veevoeder:

¹¹Ir. W.L. Jansen, 1999

β -glucanase: splitst beta-glucanen (zetmeelmoleculen) in oligomeren en is van toepassing in granen, gerst en rogge.

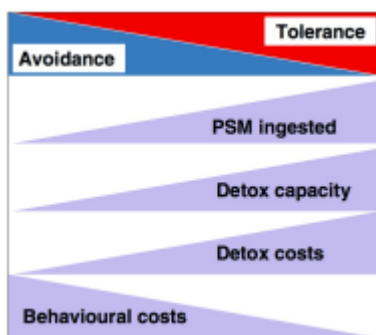
Xylanase: Splitst xylaanketens en is van toepassing in granen en graan(bij)producten.

Fytase: Dit enzym splitst fosfaat af van fytaatcomplexen en is van toepassing in fytaathoudende grondstoffen (granen en soja).

Mannanase: Dit is een enzym dat mannanasebestandsdelen afbreekt en is van toepassing bij soja en maïs.¹²

3.2 Probleem in de praktijk¹³

Herbivoren wenden zich tot strategieën om antinutritieele factoren (zoals tannine) te verwerken. Dit is de tannine-herbivoor wisselwerking. Iason en Villalba (2006) kunnen vanuit verschillende studies stellen dat er een co-evolutie bestaat tussen enerzijds het reduceren en/of vermijden van struikgewas met antinutritieele factoren en anderzijds het opnemen en tolereren van struikgewas met antinutritieele factoren. Deze twee extremen hangen op een omgekeerd evenredige manier samen (fig. 2).



Figuur 2: Grafische weergave van de omgekeerd evenredige relatie tussen twee extreme strategieën (naar Glenn Iason en Villalba, 2006) PMS = Plant Secondary Metabolites = ANF

Een zo'n strategie is deze waarbij de planten, rijk aan antinutritieele factoren, vermeden worden. Dit gaat dan ten koste van de opgenomen hoeveelheid voeder. Doordat er meer tijd moet worden gestoken in de afstand die nodig is voor de zoektocht naar alternatieve nutritioneel waardevolle planten, daalt de opname van voeder.

Voor een andere strategie, waarin planten rijk aan antinutritieele factoren, worden opgenomen en getolereerd is dan weer een sterke fysiologische adaptatie nodig.

Dat een herbivoor ofwel voor het ene ofwel voor het andere kiest is onwaarschijnlijk, er zal meestal gezocht worden naar een middenweg (Iason en Villalba, 2006). Door voor een weiland te kiezen met voldoende biochemische diversiteit krijgen de herbivoren de mogelijkheid om door selectief grazen de effecten van antinutritieele factoren tegen te werken.

¹² GMO Compass, 2010

¹³ http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/460/223/RUG01-001460223_2011_0001_AC.pdf

3.3 Noodzakelijke voorkennis

3.3.1 Analyse methodologie

Om de analyses op de genomen stalen (meststalen) uit te voeren wordt er gebruik gemaakt van enzymassays om de enzymwerking te bepalen op het voeder. Daarnaast worden er nog andere methoden gebruikt voor de bepaling van vetten, eiwitten, ruwe celstof en suikers in het voeder. Al deze methoden zullen later meer in detail worden voorgelegd in punt 4 Materiaal en methoden.

3.3.2 Het varken als proefdier

Het varken wordt niet enkel gebruikt als een proefdier waarvan de resultaten van de experimenten van belang zijn voor de humane geneeskunde maar ook bij proeven die van belang zijn voor de varkenshouderij. Wanneer een varken als laboratoriumdier wordt gekozen kan er een keuze worden gemaakt tussen 'gewone' varkens of speciaal voor een bepaald doel gefokte (miniatuur)varkens. Voor het onderwerp van dit eindwerk zullen 'gewone' industriële varkens worden gebruikt in de experimenten, omdat deze het meest gezien worden in de praktijk. Het gaat hier over een praktijkgericht onderzoek.¹⁴

3.3.2.1 Soort en behandeling¹⁵

De biggen, die worden gebruikt zijn hybriden tussen Dutch Landrace en Large White, die afkomstig zijn van productieve kwekers waar ze worden gespeend op een leeftijd van 21 dagen.

Bij het spenen en op bepaalde data na het spenen (wanneer de proef start, na 1 week in de proef, op het einde van de proef) worden alle biggen individueel gewogen. De gegevens die dan verkregen worden zijn afhankelijk van de gewichtsevolutie van de biggen en het resterende voeder. Wanneer de biggen gespeend worden komen ze terecht op het proefbedrijf en worden ze geormerkt met een nieuw Sanitelnummer.

Per kooi van 4 biggen wordt de voederopname geregistreerd op het moment van het wegen (4 behandelingen: A,B,C en D x 8 herhalingen x 4 biggen; zie protocol). De biggen worden 3 weken in het experiment gehouden (tot 20 kg). Daarna worden ze nog eens 3 weken opgekweekt (tot 40 kg). Ten slotte gaan ze terug naar de productie (tot 105kg) waar ze worden geslacht en kunnen worden bereid voor consumptie.

Tijdens de proef, controleren een dierenarts en een Felasa D verklaarde persoon het uitgevoerde biggenexperiment volgens de internationale richtlijnen die in wet EC/86/609 worden beschreven. Wat zij dus opvolgen zijn de klinische score, feces score, gedrag big, koorts, ziektebeelden, ... Op deze manier kan worden nagegaan of de dieren geen ziektes meedragen van hun "vorig leven". Zo kunnen ze bv. streptokokken oplopen tijdens het transport.

3.3.2.2 Hanteren en eenvoudige technieken

Afhankelijk van de leeftijd en het gewicht van het dier zijn er verschillende technieken voor de hantering mogelijk. Jonge dieren (5kg) kunnen bij de achterpoten worden genomen en dan in beide armen worden gedragen. De zwaardere dieren moeten onmiddellijk worden ondersteund met een arm onder de borst en de buik, met de kop naar achteren gericht. Het

¹⁴Fokkinga A. en Marleen Felius A., 2004

¹⁵Pdf Vitamex, 2011

dier wordt dan met de elleboog tegen het lichaam gefixeerd. Doordat deze dieren zeer hoogtonig kunnen zijn wordt er aangeraden om oorbeschermers te dragen. De identificatie gebeurt met een oorlabel. En er wordt gevaccineerd en behandeld tegen ecto- en endoparasieten ter preventie van infectieziekten.¹⁶

3.3.2.3 Huisvesting¹⁷

Varkens zijn sociale dieren en leven in het wild in groepen, ook zijn ze zeer nieuwsgierig. Daarom is het beter om deze dieren in groepen te huisvesten. Er wordt aangewezen om strooisel te voorzien. Dit dient zowel voor speelmateriaal als voeder. Andere kooiverrijkmateriaal zijn hooi, een bal, een opgehangen ketting, papieren voerzak en dergelijke. De relatieve vochtigheid licht tussen de 40 en 60%. Volwassen dieren hebben een omgevingstemperatuur nodig van 24°C, voor pasgeboren biggen is dit 30-32°C. Een dier van minder dan 50 en 100kg heeft een minimale oppervlakte nodig van 0,7-1,0 m² per dier. Enkele fysiologische parameters zijn terug te vinden in tabel 7 in bijlage 3.

Hoe de dieren worden gehuisvest voor deze proef wordt volledig besproken in '4.2 Dierenproef'.

3.3.3 Gastro-intestinaalkanaal van het varken¹⁸

In volgende punten worden de verschillende anatomische delen van het gastro-intestinaal kanaal van het varken besproken volgens de volgorde waarin het voedsel ze tegenkomt.

3.3.3.1 Mondholte

De binnenkant van de mondholte is bedekt door een slijmvlies. Door de aanwezigheid van een groot aantal speekselklieren produceert het varken een aanzienlijke hoeveelheid speeksel. De belangrijkste is de oorspeekselklier (parotis). Deze produceert de helft (7,5l) van de totale hoeveelheid speeksel dat het dier produceert per dag. De aanwezigheid van enzym **amylase**, in het speeksel, zorgt voor de afbraak van koolhydraten in de voeding.

Bij het voederen van de dieren moet er rekening worden gehouden dat deze hoogstwaarschijnlijk de pavlofreflex zullen vertonen. Hierbij zal het dier, bij bepaalde prikkels (geluiden, vormen), snel de link leggen naar voedsel en zijn maag-darmkanaal klaar maken voor de vertering. Wanneer er dus laattijdig wordt gevoederd is de maag klaar maar er komt geen voeder. Dit kan lijden tot maagzweren. Indien er te vroeg wordt gevoederd is de maag nog niet klaar en zal het dier zijn voeder slecht kunnen verteren.

Vervolgens komen de **keelholte** en **slokdarm** aan bod. In de slokdarm wordt de voedselbolus verplaatst naar de maag via peristaltische bewegingen.

3.3.3.2 Maag

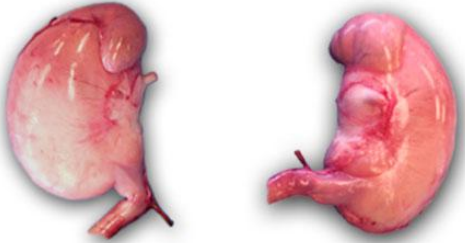
De maag is gelokaliseerd aan de linkerbuikwand van het varken. De productie van slijm en maagsap gebeurt door klieren die zich in verschillende zones in de maagwand bevinden. De maag zelf kan worden verdeeld in een vijftal delen nl. diverticulum, slokdarmgedeelte,

¹⁶Van Zutphen et al, 2009

¹⁷Van Zutphen et al, 2009

¹⁸Wouters F., 2009-2010

pylorusgedeelte, cardiagedeelte en fundusgedeelte. Het cardiagedeelte zorgt voor de productie van **slijm** om het slijmvlies aan de binnenkant van de maag te beschermen. Het fundusgedeelte zorgt voor de productie van **maagsap** en bepaalde enzymen nl. **lipase** en **protease**. Dit maagsap bevat HCl of zoutzuur. De hoeveelheid dat hiervan wordt afgescheiden wordt bepaald door stressituaties (eten, slecht stalklimaat, overbevolking). Bij aanwezigheid van deze laatste factoren zal er meer maagsap worden afgescheiden. Hierdoor kan een overvloed ontstaan die aanleiding geeft tot maagzweren. De pH in de maag gaat van 2,1 tot 3. Door deze zuurtegraad is er geen microbiële groei.



Stomach of the pig

Figuur 3: Varkensmaag

3.3.3.3 Dunne darm

De dunne darm kan worden onderverdeeld in het duodenum, jejunum en ileum. Er wordt **gal** en **pancreassap** toegevoegd in het duodenum. De enzymen die eerder werden toegevoegd aan de voedselbolus krijgen hier de tijd om in te werken. Zo zal lipase (vanuit de lever) vetten omvormen naar glycerine en vetzuren, hetzelfde geldt voor lipase vanuit de maag. Ook zal pancreatine inwerken. Dit is een mengsel van verschillende enzymen nl. protease (bv. Trypsine), amylase en lipase. Het protease trypsine staat in voor de afbraak van eiwitten en vetzuren, amylase zal zetmeel (amylose) reduceren. Verder kunnen ook de ecto-enzymen (vanuit het voeder) hier hun werk doen (β -glucanase, xylanase, fytase, mananase).

Aan de binnenkant van de dunne darm zitten veel darmvlokken met darmvilli. Deze zorgen voor de vergroting van het absorptieoppervlak. Door darmklieren, die zich over de hele lengte van de dunne darm bevinden, wordt **darmsap** afgescheiden. Uiteindelijk mondt de dunne darm uit in de dikke darm.

Figuur 4: Darmvilli en crypten¹⁹

¹⁹<http://www.structobalans.nl/onderzoekqd.htm>

3.3.3.4 Lever en gal

Bij het varken is het zo dat de galblaas voor een deel in de lever verzonken ligt. Deze vangt het **galvocht** op dat vanuit de lever werd geproduceerd. Dit galvocht bevat galzure zouten en lecithine. De functie van deze stoffen is het emulgeren van vetten.

3.3.3.5 Pancreas – buikspeekselklier – alvleesklier

Het spijsverteringssap dat wordt geproduceerd door de pancreas bevat zeer veel enzymen. Namelijk **trypsine** en **chymotrypsine** die eiwitsplitsende enzymen zijn. **Lipase** dat een vetsplitsend enzym is en **amylase** dat een enzym is dat koolhydraten splitst.

3.3.3.6 Dikke darm en blinde darm

De dikke darm en de blinde darm zijn beide zo goed als neutraal van zuurtegraad (dikke darm: 6,8 en blinde darm: 7,2). Hierdoor kunnen **micro-organismen** er zich vestigen en groeien. Het zijn deze micro-organismen die zorgen voor de vertering van cellulose en zo vluchtige vetzuren produceren. Deze worden op hun beurt opgenomen door de colonwand en vormen zo een energiebron voor het organisme.

Vervolgens is er de **endeldarm** of rectum. Hier worden feces opgestapeld.



Figuur 5: Dikke darm van het varken

3.3.4 Passagesnelheid doorheen het spijsverteringskanaal²⁰

Het duurt ongeveer 24 uur voor het voedsel de volledige doorgang heeft gemaakt doorheen het maag-darmkanaal van het dier. De passagesnelheid doorheen de verschillende delen is echter geen constante. Deze is afhankelijk van de vorm van het voeder (meel, korrel), de samenstelling, de concentratie en de voederfrequentie.

3.3.5 Functie van de maagdarmflora²¹

Wanneer een big geboren wordt heeft het nog geen zure pH in de maag, maar een neutrale pH. Hierdoor kunnen bacteriën, afkomstig van de feces van de moeder en/of het kraamhok,

²⁰ Wouters F., 2009-2010

²¹ Wouters F., 2009-2010

gemakkelijk binnendringen. Dit gaat zo gemakkelijk omdat er nog geen “zuurbarrière” aanwezig is.

Zo zijn er, 24 uur na de geboorte, veel melkzuurbacteriën, colibacteriën en streptokokken binnen gekomen in het darmkanaal. Door het drinken van melk komt er lactose in de maag terecht. Deze wordt omgezet door de melkzuurbacterie in melkzuur. Hierdoor zal de pH in de maag sterk beginnen dalen wat een negatieve invloed heeft op de aanwezigheid van micro-organismen op deze plaats. Deze kunnen er niet meer actief zijn en zullen worden verteerd tot microbieeelwit.

3.3.6 Voedereenheden

Bij de voedereenheden komen de energie, eiwit, vet, ruwe celstof en suiker aanbod.

3.3.6.1 Energie²²

Bij varkensvoeder kunnen er 2 verschillende eenheden worden aangehaald voor de energie nl. **Netto energie varken** (NEv) en **energiewaarde** (EW)

De **netto energie varken** drukt uit hoeveel Megajoules of Kilocalorieën, per kg van dat voedermiddel, die bij de gewichtsaanzet van varkens maximaal kan worden vastgelegd en wordt uitgedrukt in KJ/kg DS.

Voor de berekening van de NEv moet er rekening gehouden worden met het verteerbaar ruw eiwit (VRE), het verteerbaar ruw vet (VRV), het ruwe celstofgehalte (VRC), de overige koolhydraten (VOK) en de mono- en disacchariden (VS: verteerbare suikers). Al deze factoren worden uitgedrukt in gram/kg product.

Naast de NEv wordt ook EW of **energiewaarde** gebruikt bij varkensvoeder. Dit komt omdat verschillende voedermiddelen dan kunnen worden vergeleken. De meeste mengvoeders beschikken over een energiewaarde van ongeveer 1 NEv gemiddeld mengvoeder = 8786 kJ/kg. De energiewaarde bij voeders voor vleesvarkens is meer dan 1 en deze voor voeders van zeugen is minder dan 1.

3.3.6.2 Eiwit²³

Het totaal eiwitgehalte van het voeder is bij varkens minder van belang. Daar bestaan 2 redenen voor nl. de verteerbaarheid van het eiwit en de aminozuursamenstelling. In tegenstelling hiervan wordt er dan wel weer meer belang gehecht aan de darmverteerbare aminozuren zoals lysine en methionine.

3.3.6.3 Vet²⁴

Een goede energiebron voor varkens zijn vetten. Deze vetten zijn opgebouwd uit verschillende vetzuren. In de opbouw van een vetmolecuul wordt er een glycerol en vetzuren gezien. De molecule kan verzadigd of onverzadigd zijn en uit lange of korte ketens bestaan.

²² Wouters F., 2009-2010

²³ Wouters F., 2009-2010

²⁴ I. Kristel (2010)

3.3.6.4 Ruwe celstof²⁵

Ruwe celstof is opgebouwd uit celwandbestanddelen o.a. cellulose. Hoe meer ruwe celstof in het varkensvoeder zit, hoe lager de energiewaarde voor het varken. Ook zal ruwe celstof invloed hebben op de structuur van de mest en het stressgehalte van het dier.

Ruwe celstof zit in ruwvoerders of droogvoeder en ruwvoedergewassen. Er kunnen 3 verschillende vormen van ruwvoeder worden onderscheiden:

- Alle voedergewassen en ruwvoedergewassen die versneden en verwerkt zijn samen met andere producten met meer dan 18% ruwe celstof of die uit meer dan 35% celwand (droge stof) bestaan. Deze zijn gewoonlijk laag in netto-energie per gewichtseenheid door de hoge celwandinhoud.
- Koolstofhoudende ruwvoerders. Deze bezitten een laag eiwitgehalte bv. stro, stelen, verweerd gras, enz.
- Eiwitachtige ruwvoerders bv. peulvruchten, hooi, gras, enz.²⁶

3.3.6.5 Suiker²⁷

Suiker speelt een belangrijke rol in de smakelijkheid van het voeder en wordt zeer goed opgenomen door jonge biggen.

Naast suiker is er ook nog zetmeel. Zetmeel is opgebouwd uit suikers (glucose). Het zit vooral in granen, wortel en knolgewassen onder de vorm van kleine korreltjes. Door de meeste dieren kan zetmeel goed worden opgenomen. Een uitzondering hierop is aardappelzetmeel. De zetmeelkorrel van de aardappelproducten moet eerst worden gebroken alvorens het varken die kan opnemen. Dit gebeurt door verhitting.

Jonge biggen kunnen zetmeel echter moeilijk verteren vanwege de compacte bouw van de zetmeelkorrels en de geringe activiteit van de enzymen in het speeksel en het pancreassap. Een oplossing hiervoor is het gebruik van ontsloten granen. Hierbij worden de zetmeelkorrels gebroken door een verhittingsproces.

Meer gedetailleerde voedernormen voor biggenvoerders zijn te vinden in bijlage 4. Alsook de afscheidingsproducten van het spijsverteringskanaal in bijlage 5. Ook wordt de samenstelling van het voeder besproken in bijlage 6, tabel 23.

3.3.7 Werking enzym

Levende cellen beschikken over de mogelijkheid om een groot aantal verscheidene reacties te laten verlopen met grote efficiëntie en specificiteit. De stoffen die hiervoor verantwoordelijk zijn, zijn de enzymen die aanwezig zijn in de cel. Deze enzymen werken in op bepaalde verbindingen. Elk enzym herkent een specifieke verbinding waarop het zal inwerken. Deze verbindingen die door enzymen worden omgezet worden substraten genoemd. Enzymen zijn eiwitten die de omzetting van een substraatkatalyseren.²⁸

²⁵ Christophe Decaigny

²⁶ Lee I. Chiba

²⁷ Christophe Decaigny

²⁸ Engbersen J.F.J. en De Groot AE. (1995)

3.3.7.1 Enzymstructuur²⁹

Zoals eerder vermeld zijn enzymen dus eiwitten. De molecuulmassa en structuur van deze eiwitten kan sterk variëren. De molecuulmassa wordt uitgedrukt in atomaire massa-eenheden (u) (en geeft ruwweg het aantal nucleonen weer). Een enzym bestaat uit polypeptideketens met aminozuren. De aantallen hiervan zullen verschillen naargelang het enzym.

3.3.7.2 Enzymcofactoren³⁰

Er zijn veel enzymen die pas hun werking kunnen uitvoeren wanneer ze gebonden zitten op een niet-proteïnecomponent. Dit component wordt dan de cofactor genoemd. Het eiwitgedeelte van het enzym dat een cofactor nodig heeft wordt het apoënzym genoemd.

Bij de enzymcofactoren kunnen er 2 groepen worden onderscheiden. De **metaalionactivator** en het **coënzym**.

De **metaalionactivator** is dan een metaalion dat aan het enzym gebonden is. Wanneer het gaat over een **coënzym** dan is er een organische verbinding (bv. Hybride-ion, methylgroep, acetylgroep) gebonden op het enzym. Zo bestaan er coënzymen voor oxidatie, reductie, alkylering, acylering, isomerisatie, decarboxylering, enz. De cofactor op zich is niet specifiek voor een bepaald substraat. Het is het geheel van cofactor en enzym dat zich specifiek op een bepaald substraat gaan richten. De samenwerking van cofactor en enzym wordt nog eens duidelijk voorgesteld in onderstaand schema.

<i>Proteïne</i>		<i>Cofactor</i>		<i>Actieve enzym</i>
Apoënzym	+	Metaalion-activator	→	Enzym (metalloënzym)
Apoënzym	+	Coënzym	→	Enzym (holoënzym)

Net zoals alle biologische verbindingen hebben ook enzymen en cofactoren een beperkte levensduur. Daarom moeten ze op tijd vervangen worden. Deze vervanging kan tot stand komen doordat er voldoende essentiële aminozuren, vitaminen en metaalionen aanwezig zijn in het dieet van het organisme.

3.3.7.3 Werking van enzymen³¹

Wanneer het enzym zich bindt op een substraat wordt er een enzym-substraat-complex gevormd. Daarna zal, door de inwerking van het enzym op het substraat, het substraat een chemische omzetting ondergaan van substraat naar product. Tenslotte gaat het product zich scheiden van het enzym, waardoor het enzym een nieuw substraatmolecule kan opnemen. Dit gehele proces wordt de enzymkatalyse genoemd.

Enzym + Substraat ↔ Enzym-Substraat-Complex ↔ Enzym-Product-Complex ↔ Enzym + Product

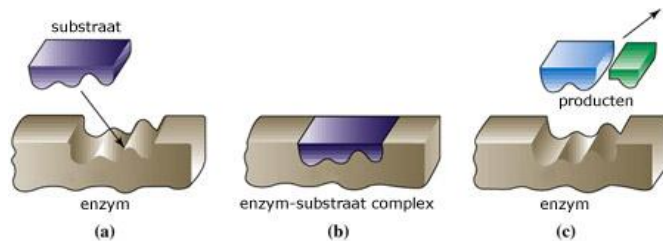
De katalytische activiteit van het enzym zit niet overal op het enzym, maar slechts op een zeer beperkt gedeelte van het enzymmolecuul. Dit wordt de actieve plaats genoemd. In de primaire structuur van de eiwitketen is het niet noodzakelijk dat de katalytische groepen dicht

²⁹Engbersen J.F.J. en De Groot AE. (1995)

³⁰Engbersen J.F.J. en De Groot AE. (1995)

³¹Engbersen J.F.J. en De Groot AE. (1995)

bij elkaar gelegen zijn. Dit komt doordat ze op de actieve plaats van het enzym bij elkaar komen door de ruimtelijke structuur van het eiwit.



Figuur 6: Werking enzym³²

3.3.7.4 Specificiteit van enzymen³³

Hoewel de meeste enzymen zeer specifiek zijn voor hun substraat (substraatspecificiteit) zijn er ook enkele enzymen die één specifieke reactie kunnen aangaan met meerdere verschillende substraten (reactiespecificiteit).

Voor de verklaring te vinden op de substraatspecificiteit moet er worden gekeken naar de vorm en de grootte van het substraat en de oriëntatie van bepaalde functionele groepen. Er moet van worden uitgegaan dat deze factoren complementair moeten zijn met minstens een deel van de actieve plaats van het enzym. Pas dan kunnen interacties ontstaan waarbij het substraat bindt aan de actieve plaats. Deze interacties komen tot stand door aantrekking van tegengesteld geladen groepen, dipool-dipool-interacties (2 dipolaire moleculen die elkaar aantrekken) en waterstofbrugvorming.

Elk enzym heeft ook nog eens een pH-optimum nodig voor zijn optimale werking. Deze hangt samen met de verandering in de interacties tussen substraat en enzym die ontstaan bij verandering van de pH.

3.3.7.5 Controlemechanisme voor enzymactiviteit³⁴

De enzymen die in een cel aanwezig zijn kunnen niet allemaal tegelijk actief zijn, anders zou er een overdaad aan chemische stoffen zich voordoen in de cel. De reacties die zich binnen in de cel afspelen variëren met de tijd. Daarom wordt de enzymactiviteit streng gereguleerd door het lichaam. Soms is er activering nodig, soms remming. Hierbij spelen volgende controlemechanismen een rol:

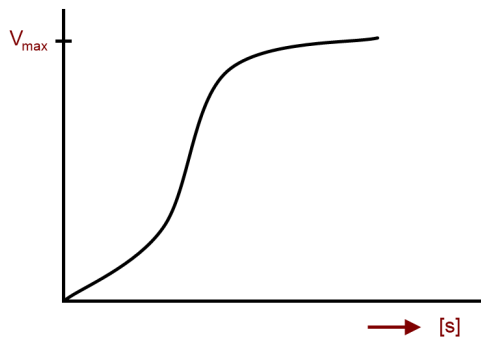
-Allosterische effecten: Niet alle enzymen reageren met een zelfde reactiesnelheid op een substraatconcentratieverhoging. De toename van reactiesnelheid verloopt bij de ene sneller dan de andere. De bijhorende grafiek (grafiek 1) heeft een uitgestrekte S-vorm waarbij reactiesnelheid en substraatconcentratie tegenover elkaar worden gezet. Alle enzymen met een gelijkaardige grafiek bezitten twee of meerdere actieve plaatsen. Indien er nog geen of slechts een van de actieve plaatsen is ingenomen door een substraat op het enzym, dan past het substraat nog niet goed in de actieve holte, maar van zodra de twee actieve plaatsen op het enzym zijn bezet wordt het enzym in een goede hervorming gedwongen, waardoor een goede katalyse kan plaats vinden. Dit wordt allosterische activering genoemd (allo = ander; sterisch = ruimte). De effector is de naam die wordt gegeven aan een

³²Ecodor.eu.

³³Engbersen J.F.J. en De Groot AE. (1995)

³⁴Engbersen J.F.J. en De Groot AE. (1995)

verbinding die een enzym kan activeren. En door de concentratie van deze effector te reguleren is de cel in staat de enzymactiviteit van dit bepaald type enzym te regelen.



Grafiek 1: Invloed van de substraatconcentratie op de reactiesnelheid bij aanwezigheid van allosterische effecten

-Enzymremming: Er kan een onderscheid worden gemaakt tussen competitieve remming en niet-competitieve remming. Het is mogelijk dat er een product wordt gevormd door het enzym zelf dat als competitieve remmer dient of dat dat product gevormd is door een aansluitende enzymatische reactie. Deze vorm van competitieve remming wordt feedbackremming genoemd. Het stelt de cel in staat bepaalde stoffen te regelen

4 Materiaal en methode

4.1 Dierenproef: gespeende biggen³⁵

Nutrition Sciences N.V.: „Effect van β -mannanase op de groeiprestaties en op microbiële ecologie en fysiologisch gedrag van het maagdarmkanaal van gespeende biggen“

- Objectief

Het doel van het experiment is het effect te onderzoeken van β -mannanase op:

- de microbiële ecologie van de maag, twaalfvingerigedarm en illeum
- de villihoogte
- de diepte van de crypten
- de prestaties (de dagelijkse groei, de dagelijkse voederopname en voederconversie) van gespeende biggen tijdens de eerste 4 weken na het spenen.

Het experiment wordt uitgevoerd in opdracht van Oekraïne. Het voeder dat wordt gebruikt is een goed voeder met uitzondering van het eiwitgehalte. Dit doordat, de soja die wordt gebruikt in het voeder, minder getoast is en er nog veel ruwe celstof aanwezig is. Het voeder werd zo samengesteld omdat de eiwitbron van het veevoeder in Oekraïne bestaat uit slechte soja (laag eiwitgehalte). Met behulp van dit experiment kan worden nagegaan of het toevoegen van een enzym, β -mannanase, aan het voeder, het slechte eiwitgehalte kan compenseren, waardoor een goed en betaalbaar voeder wordt gecreëerd.

Het gebruik van proefdieren is bij deze proef verantwoord omdat er validatie moet gebeuren bij de doeldiersoort en het product dat getest werd is een prototype product. De opbrengst van het experiment en het gebruik van proefdieren wegen tegen elkaar op want er moet via een klein aantal dieren worden gekeken of het product geen schade aanbrengt in het dier. Er worden dus een klein aantal dieren opgeofferd om volledige varkensstallen te vrijwaren tegen adverse effecten in de toekomst.

Deze dierenproef werd goedgekeurd door de ethische commissie van de universiteit Gent.

- Plaats

Het experimentele landbouwbedrijf voor jonge biggen is gelegen in Vlaanderen (België) en bestaat uit 8 batterijen, die elk 4 boxen bevat.

- Dieren

Deze paragraaf werd eerder al besproken in '3.4.2.1 Soort en behandeling'.

- Huisvesting

Figuur 5 illustreert de algemene infrastructuur van de 4 batterijen van het experimentele landbouwbedrijf. Figuur 6 geeft een beeld van binnenin één batterij. Elke kooi (1.5m x 1.5m) bevat 4 biggen bij het begin van de proef. Voor elke kooi, is één voeder (ad libitum) gereserveerd voor meel (of korrels). Één drinkbak is geïnstalleerd per kooi. Het voeder wordt verdeeld onder de kooien zoals weergegeven in Figuur 5. De temperatuur bij het begin van de proef bedraagt $28 \pm 2^\circ\text{C}$ tot 10 dagen na het spenen. Daarna, wordt de temperatuur

³⁵ "Effect of on growth performance and on microbial ecology and physiological behaviour of the intestinal tract of weaning piglets", pdf, Vitamex, 27/07/11

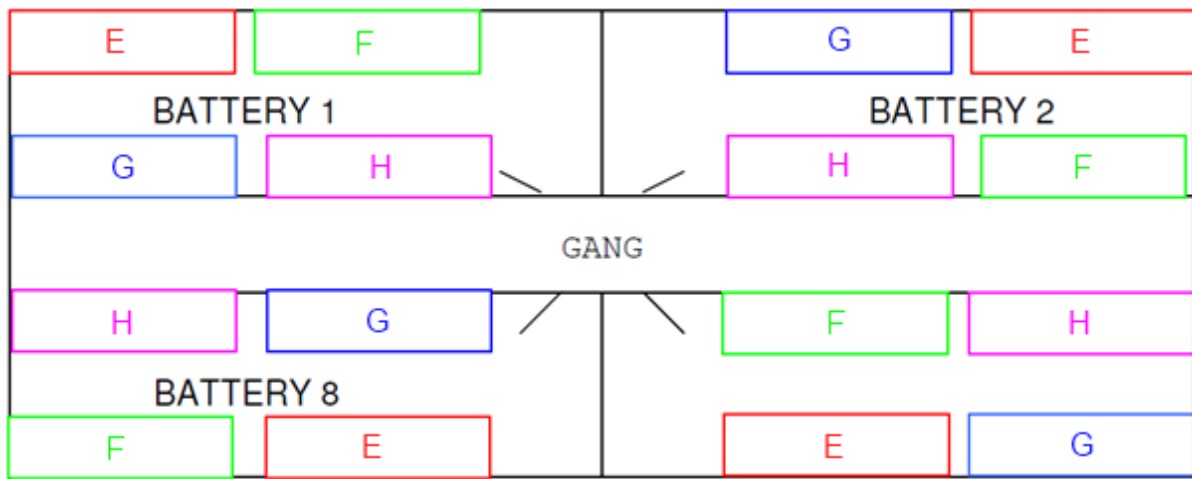
verminderd naar $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Deze waarden benaderen de praktijkomstandigheden. Het is belangrijk dat deze waarden worden toegepast zodat het dier aan een minimum hoeveelheid stress is onderworpen die de voederopname kan beïnvloeden.

Voor dit experiment worden slechts 4 batterijen gebruikt, met telkens 4 boxen, die 4 biggen onderhouden. Dit maakt een totaal van 64 biggen voor het experiment. De andere 4 batterijen zijn voor een ander voederexperiment.

- Periode

Eind van de proeftijd: 04-06-2012

Begin van de proeftijd: 07-04-2012



Figuur 7: Het overzicht van 4 batterijen die uit 4 boxen bestaan in het experimentele landbouwbedrijf

E = controle dieet/4 biggen per kooi

F = controle dieet met 104 ml β -mannanase /100kg voeder/4 biggen per kooi

G = controle dieet met 208 ml β -mannanase /100kg voeder/4 biggen per kooi

H = controle dieet met positieve controle /100kg voeder/4 biggen per kooi



Figuur 8: Binnenzicht van 1 batterij

- Dieet

Tijdens de proef wordt commercieel niet met medicijnen behandeld voeder gegeven. 'Niet met medicijnen behandeld' betekent dat de big geen therapeutische antibiotica vóór en tijdens de proef ontvangt. De diëten worden gegeven in de vorm van een meel. De dieren zijn Ad random gekozen en zijn pas gespeende praktijkdieren, dus is er geen specifieke selectie gebeurt naar ziekte.

Het voeder wordt gegeven van het spenen tot vier weken na het spenen:

- E: Het controledieet /4 biggen per kooi
- F: Het controledieet + 104 ml β -mannanase /100kg voeder/4 biggen per kooi
- G: Het controledieet + 208 ml β -mannanase /100kg voeder/4 biggen per kooi
- H: Het controledieet + positieve controle /100kg voeder/4 biggen per kooi

- Voedselanalyse

Alle diëten worden geanalyseerd door het laboratorium van Nutrition Sciences N.V. (NS) op % ruw eiwit, % ruw vet, % ruwe as, % ruwe vezel, % vocht en hoeveelheid P, Ca, Na, Fe, Cu, Zn en Mn. De analyse van P, Ca, Na, Fe, Cu, Zn en Mn zal worden uitgevoerd met I(nduced) C(oupled) P(lasma), dat een meer betrouwbare methode is dan A(tomic) A(bsorption). De norm die wordt gebruikt is ISO 6869 (= diervoeders - bepaling van de gehalten aan calcium, koper, ijzer, magnesium, mangaan, kalium, natrium en zink - methode met gebruik van atomaire-absorptiespectrometrie).

"Monsters van de voeders worden opgeslagen gedurende 3 maanden na analyse. De analyse van het voeder wordt uitgevoerd vóór het begin van de proeven. Op verzoek, kunnen andere analyses worden uitgevoerd.

- Proefontwerp

4 behandelingen (E, F, G, H) x 4 herhalingen x 4 biggen

Behandeling
- E : Controle dieet
- F : Controle dieet + 104 ml β -mannanase/100kg voeder
- G : Controle dieet + 208 ml β -mannanase/100kg voeder
- H : Controle dieet + positieve controle

Vlak voor de proef van start gaat worden alle dieren gewogen en geormerkt. Bij het begin van de proef, worden de biggen (rond 7 kg lichaamsgewicht) op basis van hun gewicht toegewezen aan de verschillende kooien via een computerprogramma. Deze toewijzing wordt gemaakt om een gelijk gemiddeld gewicht en een gelijke standaardafwijking rond het gemiddelde gewicht te bekomen voor elke behandeling en kooi.

Bij elk voeder worden zowel grote als kleine groepen biggen geplaatst, waarbij de kleine dieren bij elkaar zitten en de grotere dieren bij elkaar. Dit komt doordat dieren groeien volgens hun begin gewicht. Dit wil zeggen dat grotere biggen vlugger zullen groeien dan de kleinere. Dit kan een vertekend beeld geven indien grote en kleine dieren in een zelfde box worden gezet. Ook worden per batterij verschillende grootte-groepen geplaatst, zo zitten er in 1 batterij niet enkel kleine biggen. Daarnaast worden de verschillende voeders per box telkens op een andere plaats in de verschillende batterijen gegeven ter controle omdat de voederopname kan beïnvloed worden door bijvoorbeeld tocht of stress van het passeren aan de deuropening van de verzorger.

Voor de microbiologische telling van gastro-intestinale flora en histologische studie, ontvangen de biggetjes een overdosis van barbituraten (Nembutal) via inspuiting in het hart gevolgd door bevestiging van de dood (door uitbloeding). Daarna, wordt een sectie uitgevoerd op de biggen. De monsters voor microbiële tellingen worden onmiddellijk verwerkt, terwijl monsters genomen voor histologische experimenten bewaard worden voor latere analyse.

- Voederprogramma

Tijdens de gehele proeftijd worden de biggen ad libitum gevoed, behalve de periode van de microbiologische telling. Op dat ogenblik, drie dagen alvorens de microbiologische telling wordt uitgevoerd, worden de biggen beperkt gevoed. De hoeveelheid verschilt naargelang hun grootte.

- Vaccinatieprogramma en medicatie

Op de boerderij, waar de dieren oorspronkelijk vandaan komen, worden ze gevaccineerd tegen Aujeszky.

Indien nodig, worden de zieke biggetjes individueel behandeld (door injectie), met Emdofluxin 0,5cc/10kg (=ontstekingsremmer) en Excenel RTU 075cc/10kg (=antibioticum). Deze behandelingen worden genoteerd (tot 3 opeenvolgende dagen voor eenzelfde dier). Indien het dier niet verbeterd, wordt het geëuthanaseerd.

- Parameters

- Individuele groeigegevens:

- o begingewicht (d.w.z. het speengewicht)
 - o gewicht bij dag 14
 - o eindgewicht
- Resultaten van de dagelijkse gewichtstoename tijdens het spenen, startperiode en de gehele proeftijd.

- De opnamegegevens van het voeder per kooi (gecorrigeerd voor eventuele verliezen³⁶):

- o globale speen periode
- o globale startperiode
- o gehele globale proeftijd

→ Resultaten in dagelijkse voederopname tijdens het spenen, startperiode en gehele proeftijd.

- De voederconversie van het voeder tijdens het spenen, start en gehele proeftijd

- Microbiële analyse (Deze resultaten worden berekend op 06/06/2012)

Lactobacilli/E.Coli/Enterobacteriaceae

Microbiële telling wordt uitgevoerd op de maag, twaalfvingerigedarm en illeum

- Histochemical analyse (Deze resultaten zullen niet bekend zijn binnen het tijdsbereik van de stage)

De hoogte van de villi en cryptdiepte van twaalfvingerdarm- en iliumstalen

12 van de 64 dieren in de proef worden geëuthanaseerd voor dissectie. De andere dieren gaan terug naar boer voor vetmesting waarna ze worden geslacht voor consumptie.

³⁶ Bij uiteindelijke verliezen, wordt de voeropname van het dode biggetje geschat door de gemiddelde voeropname per big in die kooi op dat ogenblik.

- Statistische analyse

De experimentele gegevens die gaan over lichaamsgewichtaanzet, voederopname en voederconversie zullen worden onderworpen aan verschillende analyses waarbij gebruik wordt gemaakt van de Algemene procedure van het Lineaire Model (Proc GLM) van de Statistische Systemen van de Analyse (SAS). De statistische hypothese van geen verschillen tussen behandelingsmiddelen zal door F-test worden onderzocht. Het significante waarschijnlijkheidsniveau wordt gezet op $P < 0,05$.

- Hygiënisch aspect

Bij de varkens wordt er 2 keer per week de mest weg gedaan om de batterijen zo proper mogelijk te houden. Zo is er minder geuroverlast en is het kuiswerk op het einde van de proef minder zwaar. Ook wordt zo de overlast aan maden en daarmee vliegen vermeden. Met een metalen trekker wordt de mest van onder de kooien getrokken tot in de goot, die in elke kamer aanwezig is, en wordt vervolgens weggespoeld met water. dit gebeurt voor alle 8 kamers.

In het labo moet de vaatwas regelmatig gedaan worden. Zo niet, stapelt alles zich op en is er geen glaswerk meer beschikbaar.

4.2 Bereiding enzym

➤ Doel

Enzym extraheren uit voedingsbodem om daarna de activiteit ervan te kunnen meten.

➤ Materiaal

- ✓ Balans
- ✓ Demiwater
- ✓ Fermentatiemedium
- ✓ Pepton (10g)
- ✓ TMK (Tarwe Kort Meel) (20g)
- ✓ Erlenmeyer (1l)
- ✓ Filterpapier
- ✓ Ammoniumsulfide
- ✓ Roersteentje
- ✓ Roerplaat
- ✓ Watten
- ✓ Aluminiumfolie
- ✓ Autoclaaf
- ✓ Dialyse membranen
- ✓ Kookpot
- ✓ Maatbeker (2l)

➤ Methode

Stap 1: Fermentatie

Allereerst wordt er fermentatiemedium in een erlenmeyer van 2l gebracht terwijl deze opwarmt en roert.

Stap 2:

Eerste oplossing van het vuur halen wanneer deze bijna kookt en laten afkoelen. Roersteentje eruit halen, watten in de hals proppen (tot goed spant) en aluminiumfolie er over.

Stap 3:

Deze eerste in de autoclaaf voor ongeveer 10min tot het stoomt. Daarna de stoomopening dicht draaien. Na nog eens 10min komt de drukwijzer in het rood. Vanaf dan nog eens 15min rekenen voor de erlenmeyers er uit mogen.

Stap 4:

Na 15min autoclaaf afzetten en laten afkoelen + inoculeren en fermenteren (+enzymactiviteit berekenen: zie assay).

Stap 5:

Tweede vloeistof centrifugeren voor 10min op 100%.

Stap 6:

Vloeistof die reeds in de bioreactor zat filtreren (schimmel en bezinksel uithalen). Daarna de gefiltreerde vloeistof verdelen over 2 erlenmeyers van 1l + 2x455gr ammoniumsulfaat/700ml vloeistof = presipitatie.

Stap 7:

Dialyse membranen afknippen van ongeveer 20cm en 5min laten koken om poriën open te krijgen. Na 5min koken, membranen eruit halen met spatel en handschoenen (niet aanraken met de huid want poriën kunnen verstopten) en deze in aluminium draaien tot gebruik.

Stap 8:

Gecentrifugeerde vloeistof weggieten, bezinksel/pallet (=enzym) houden en in een dialyse membraan steken, deze dicht knopen en in een beker met demiwater laten roeren met roerstaafje over nacht → enzym wordt ontzout. Het zout komt in het water door osmose = Dialyseren.

Stap 9:

Ontzoute enzym zuiver, 10x verdunnen en 100x verdunnen + enzymactiviteit bereken (zie enzym assays).



Figuur 9: Dialysmembranen gevuld met pallet

4.3 Aanmaak voeder

Het voeder is samengesteld door verschillende componenten. Zo moet er in voeder eiwit, vet, suiker/zetmeel, vocht, mineralen, lactose, vitaminen en sporenelementen aanwezig zijn. Additioneel zijn ook componenten aan het voeder toegevoegd die het dier helpen zoals aroma's en enzymen. De aroma's maken het voeder aantrekkelijk voor het dier om het te eten en de enzymen helpen bij de vertering. Daarnaast worden er nog hulpstoffen aan toegevoegd die de fabriek helpen. Dit zijn bv. talk, antioxidanten,...

Dit zijn allemaal nutritionele componenten van het voeder.

Bij het maken van het voeder krijgen al deze componenten een naam en worden ze in bepaalde hoeveelheden gemengd waardoor een voeder wordt verkregen.

Bv. In het voeder zit er 3,6% havermout, dan wordt er 3,6 gram havermout afgewogen voor 100 kg voeder.

In bijlage 6 wordt de volledige samenstelling van het voeder weergegeven in tabel 23.



Figuur 10: Verschillende componenten van het voeder worden bij elkaar gemengd



Figuur 11: Tijdens het mengen wordt het enzym aan het voeder toegedruppeld

4.4 Enzymassay: β -mannanase

➤ Doel

Het doel van de enzymassay is het meten van de enzymactiviteit aan de hand van kleurverandering door het meten van de lichtabsorptie met de fotospectrometer. Deze geeft een waarde waaruit het aantal units kan berekend worden.

Formule:

$$U = \frac{\# \text{ mannanase}}{T \cdot pH \cdot t}$$

mannanase = verschil tussen ABS reeks 1 en ABS reeks 2

T = 40°C

pH = 7.5

t = 45min

➤ Materiaal:

- ✓ Analytische balans
- ✓ Staal/substraat (voeder met β -mannanase)
- ✓ Soja-extracten
- ✓ Gedemineraliseerd water
- ✓ Pipet
- ✓ Maatcilinder 100ml (1)
- ✓ Erlenmeyer 250ml (3)
- ✓ Centrifugeerbuisen (4)
- ✓ Maatkolf 250ml (3)
- ✓ Proefbuisen (6) LBG
- ✓ Proefbuisen (12) DNS
- ✓ Kookpot
- ✓ Spectrofotometer
- ✓ Micropipet
- ✓ DNS (= 3,5-dinitrosalicylic acid (phenol))

➤ Methode

Stap 1:

3 x 5,00g staal afwegen op analytische balans
 3 x 2,00 g activator afwegen op analytische balans
 3 x 100ml demiwater afmeten in maatcilinder

} Samenvoegen in 3 erlenmeyers 250ml
 + Schudden voor 45min.

→ Activator zorgt voor een vlottere extractie van het enzym.

Stap 2:

Mengsel in 3 centrifugeerbuisen brengen, evenveel gevuld. 4^{de} buis vullen met water.
 10 minuten centrifugeren.
 → Enzym wordt gescheiden van het voeder

Stap 3:

3 x maatkolf 250ml vullen met trisbuffer (pH7.5), 1ml enzym (per centrifugeerbuis een andere maatkolf), aanvullen met demiwater tot ijkstreep. + homogeniseren.

Stap 4:

6 x afwegen van 3,00g fermentatiemedium in proefbuis (3g/proefbuis), 15 min in warmwaterbad van 40°C.

12 x 1,5 ml DNS in proefbuis.

Stap 5:

Om de 30sec 600 μ l van enzymmengsel bij fermentatiemedium voor alle 6 proefbuizen + vortexen.

Na 5min (tijdstip 0') om de 30sec 600 μ l van fermentatiemedium-mengsel in proefbuizen met DNS (6x) + vortexen, *reeks 1*.

Na 50min (tijdstip 45') om de 30sec 600 μ l van fermentatiemedium-mengsel in proefbuizen met DNS (6x) + vortexen, *reeks 2*.

Stap 6:

Alle 12 proefbuizen (2 reeksen) in rekje plaatsen en in een pot met kokend water zetten voor 5min.

Daarna overplaatsen naar koudwaterbad.

Stap 7:

Oplossing in cuvetjes brengen in spectrofotometer en per reeks de lichtabsorptie meten bij 550nm.

➤ Besluit

Er bestaat een verschil tussen reeks 1 en reeks 2. De absorptiewaarden bij reeks 2 liggen hoger dan bij reeks 1. Dit komt omdat er meer licht geabsorbeerd werd bij reeks 2 (de oplossing was donkerder) doordat het enzym na 50min in meer deeltjes is gesplitst, doordat het langer bij een hoge temperatuur heeft gezeten, waar het DNS zich mee kan binden.



Figuur 12: Warmwaterbad waarin proefbuizen met fermentatiemedium en enzym zit

4.5 Bepaling van het ruw vetgehalte

➤ Doel

Met dit protocol kan het gehalte aan ruw vet in diervoeders gemeten worden. Door gebruik te maken van petroleumether kan het vet geëxtraheerd worden volgens het Soxtec systeem.

➤ Materiaal

- ✓ Analytische balans
- ✓ Staal/substraat
- ✓ Petroleumether (kooktraject 40-60°C)
- ✓ Soxtec extractieapparaat
- ✓ Elektrisch verwarmde droogstoof (met thermostaat)
- ✓ Kartonnen extractiehulzen (doorsnede 26mm, hoogte 60mm)
- ✓ Watten
- ✓ Metalen bekertjes (van extractieapparaat)

➤ Methode

Stap 1:

6 x 3,00g (m2) van verschillende stalen afwegen op de analytische balans (tot op 0,1mg). Daarna elk staal in een kartonnen extractiehuls brengen. Hierop wordt een propje watten geplaatst waarna de hulzen in het extractieapparaat kunnen worden gebracht.

Stap 2:

6 metalen bekertjes afwegen (m1) op de analytische balans (tot op 0,1mg) + deze vullen met 100ml petroleumether. Daarna deze in het extractieapparaat brengen onder de kartonnen hulzen. De hulzen laten zakken totdat ze in de bekertjes met ether komen.

Stap 3:

Het extractieapparaat aanzetten en laten extraheren gedurende 30min bij een temperatuur van 110°C (=warme extractie).

Stap 4:

Na 30min de extractiehulzen omhoog brengen, tot boven vloeistofniveau, via hendel aan de machine en nogmaals laten extraheren gedurende 30min (=koude extractie).

Stap 5:

De extractie is ten einde. De bekertjes kunnen uit het toestel worden gehaald en in de droogstoof worden geplaatst voor 1uur bij een temperatuur van 102°C.

Stap 6:

De bekertjes kunnen uit de droogstoof gehaald worden en deze laten afkoelen voor ongeveer 10min.

Stap 7:

Ten slotte kunnen de bekertjes opnieuw worden afgewogen (m3) in de analytische balans tot op 0,1mg nauwkeurig.

➤ **Besluit**

Door het gewichtsverschil te berekenen tussen de bekertjes voor en na de extractie kan het vetgehalte worden berekend.

$$\% \text{ ruw vet} = ((m_3 - m_1) / m_2) * 100$$

m_1 = massa bekertje

m_2 = massa monster

m_3 = massa beker + monster na drogen



Figuur 13: Extractieapparaat voor vet, met extractiehulzen

4.6 Bepaling van het ruwe celstofgehalte

➤ Doel

Aan de hand van dit protocol kan het gehalte aan ruwe celstof worden bepaald. Deze is een, in zuur en base onoplosbaar, vetvrij organisch bestanddeel. Om deze bepaling te kunnen maken moeten de eiwitten, verteerbare koolhydraten en vet uit het monster gehydrolyseerd worden. Dit gebeurt door de monsters achtereenvolgens te koken in voorverwarmd zwavelzuur en kaliumhydroxide. Daarna wordt het residu gefiltreerd, uitgewassen, gedroogd en verast. Door het gewichtsverlies te berekenen kan het gehalte ruwe celstof bepaald worden.

➤ Materiaal

- ✓ Analytische balans
- ✓ Staal/substraat
- ✓ Zwavelzuur H_2SO_4 0,26N
- ✓ Kaliumhydroxide KOH 0,23N
- ✓ Antischuimmiddel (bv. 1-octanol)
- ✓ Aceton
- ✓ Zeezand (vooraf gedroogd en gegloeid)
- ✓ Fibertec ruwe celstofapparatuur
- ✓ Glazen filterkroesjes (porositeit P2)
- ✓ Elektrisch verwarmde droogstoof (met thermostaat)
- ✓ Elektrisch verwarmde moffeloven (met thermostaat)
- ✓ Exsiccator

➤ Methode

Stap 1:

6 x 1,00g van verschillende stalen afwegen op de analytische balans (tot op 0,1mg). Daarna elk staal in een glazen filterkroesje brengen + in elk kroesje een schepje zand.

Stap 2:

Een kan vullen met zwavelzuur (H_2SO_4) en deze voorverwarmen.

Grote hendel van oranje vacummachine naar beneden brengen, de andere hendels op 'pressure' brengen. Vervolgens de kroesjes op de machine zetten + 2x petroleumether over gieten en wachten tot alles is weggelopen. Dit is het spoelen of ontvetten van de stalen.

Stap 3:

Alle kroesjes in het Fibertec apparaat plaatsen en 100ml zwavelzuur toevoegen. Dit wordt aan de kook gebracht in het apparaat gedurende 30min.

Stap 4:

Na 30min wordt de oplossing afgezogen en wordt er 3x nagespoeld met gedestilleerd water. Daarna wordt er 100ml kaliumhydroxide (KOH) toegevoegd die wederom gedurende 30min aan de kook wordt gebracht.

Stap 5:

De oplossing wordt weer afgezogen na deze 30min en enkele keren nagespoeld met gedestilleerd water tot het monster kwantitatief terug in het kroesje zit.

Stap 6:

De kroesjes worden in de droogstoof geplaatst overnacht, bij 102-103°C.

Stap 7:

De volgende dag kunnen de kroesjes uit de stoof worden gehaald en laten afkoelen in een exsiccator. Daarna kunnen ze worden afgewogen tot op 0,1mg.

Stap 8:

Daarna worden de kroesjes in de moffeloven gebracht waar de stalen worden verast gedurende 120min bij 485°C.

Stap 9:

Ten slotte kunnen de kroesjes worden afgekoeld en gewogen tot op 0,1mg.

➤ Besluit

Door het gewichtsverlies te berekenen tussen de kroesjes voor en na de extractie kan het percentage aan ruwe celstof worden berekend.

$$\% \text{ ruwe celstof} = ((m2-m3)/m1)*100$$

m1 = massa monster

m2 = massa filterkroesje + monster na drogen

m3 = massa filterkroesje + monster na verassen



Figuur 14: Het Fibertec apparaat voor ruwe celstofanalyse, met kroesjes

4.7 Jodometrische suikerbepaling volgens Luff-Schoorl

➤ Doel

Met behulp van dit protocol wordt het totale suikergehalte bepaald na inversie, berekend als het gehalte aan saccharose. De bepaling gebeurt volgens de methode van Luff-Schoorl.

➤ Materiaal

- ✓ Analytische balans
- ✓ Staal/substraat
- ✓ Carrez A oplossing: 42,2g $K_4[Fe(CN)_6]$ /l
- ✓ Darrez B oplossing: 57,5g $ZnSO_4$ /l
- ✓ Waterstofchloride HCl 3%
- ✓ Natriumhydroxide NaOH 3%
- ✓ Zwavelzuur H_2SO_4 3mol/l
- ✓ Dinatriumthiosulfaat $Na_2S_2O_3$ 0,1mol/l
- ✓ Kaliumjodide oplossing KI 30%
- ✓ Puimsteenkorrels
- ✓ Methyloranje 1g/l
- ✓ Luff-Schoorl reagens
- ✓ Zetmeeloplossing
- ✓ Schudtoestel
- ✓ Warmwaterbad met thermostaat
- ✓ Automatische buret
- ✓ Ploofilters, diameter 150mm

➤ Methode

Stap 1:

Stalen worden afgewogen: 2,50gr. Deze gaan elk in een aparte maatkolf van 250ml, waarbij nog 100ml demiwater wordt aan toegevoegd. Dit mengsel wordt gedurende 1u geschud.

Stap 2:

Vervolgens wordt er aan elke maatkolf 5ml Carrez A en 10ml Carrez B toegevoegd en wordt het mengsel aangelengd met demiwater tot aan de streep van de maatkolf.

Stap 3:

De oplossing van elke maatkolf wordt elk apart gefilterd over een ploofilter in een beker van 250ml via een trechter.

Stap 4:

Van deze gefiltreerde oplossing wordt er 50ml gepipetteerd in een maatkolf van 100ml en worden er 3 druppels (tot roze verkleuring) methyloranje en 3 druppels HCl 3% en 15ml HCl 0,1% toegevoegd aan de oplossing.

Stap 5:

Daarna gaan de kolven in een warmwaterbad voor 30min bij kokend water. Pipetteer 20ml Luff-Schoorl (blauw) in een erlenmeyer.

Stap 6:

Na 30min de kolven laten afkoelen onder stromend water, daarna 15ml NaOH 0,1% toevoegen en aanlengen met demiwater tot aan de streep

Stap 7:

Vervolgens wordt er 20ml van de oplossing gepipetteerd bij de Luff-Schoorl + een roersteentje

Stap 8:

Daarna wordt de inhoud van de erlenmeyers aan de kook gebracht boven een bunsenbrander. Elke erlenmeyer is voorzien van een terugvloeiakoeler. De oplossing wordt gekookt voor 10-15min.

Stap 9:

De erlenmeyers worden dan weer afgekoeld onder stromend water, waarna 10ml KI 30% (via pipet), 25ml H₂SO₄ 3mol/l (via maatcilinder) en 12,5ml (tot zwartverkleuring) zetmeeloplossing wordt toegevoegd. H₂SO₄ wordt langzaam bij de oplossing gedaan tijdens het zwenken (telkens wachten tot schuim weg is).

Stap 10:

Titreer, via een buret, met Na₂S₂O₃ 0,1mol/l tot wit-roze verkleuring.

➤ Besluit

Het gehalte van totale suikers wordt berekend door een vermenigvuldiging van het aantal mg saccharose (zie tabel) met het verschil tussen beide titraties uitgedrukt in ml natriumthiosulfaatoplossing met 100 en dit geheel te delen door de massa van het staal/monster.

$$\% \text{ suiker} = (\text{aantal mg saccharose} \times V \times 100) / M$$

M = massa monster

V = gebruikte verdunning

4.8 Bepaling van het eiwitgehalte

➤ Doel

Dit protocol beschrijft de wijze om het gehalte aan ruw eiwit vast te stellen in veevoeders, door het gehalte aan stikstof te bepalen volgens de Kjeldahlmethode.

Het monster wordt gedestruëerd langs natte weg met zwavelzuur (H_2SO_4). Wanneer hier natriumhydroxide aan wordt toegevoegd, wordt de oplossing alkalisch. Hierdoor wordt ammoniak verdreven uit ammoniumsulfaat. Het vrijgekomen ammoniak wordt vervolgens in een bekende hoeveelheid boorzuoroplossing overgedestilleerd. Deze laatste oplossing wordt daarna getitreerd met zwavelzuur ten opzichte van methylrood, met een kleuromslag van rood naar blauw.

➤ Materiaal

- ✓ Analytische balans
- ✓ Staal/substraat
- ✓ Zwavelzuur H_2SO_4 0,5mol/l
- ✓ Boorzuoroplossing H_3BO_3 1%
- ✓ Kjeldahl stikstof apparatuur (bestaande uit een destructie eenheid en een (semi)automatische destillatie eenheid)
- ✓ Glazen destructiebuisen
- ✓ Demiwater
- ✓ Natriumhydroxide (NaOH) 33%
- ✓ Boorzuoroplossing
- ✓ Katalisatortabletten (1000 KJELTABS CX en 1000 KJELTABS S)
- ✓ Mengindicator: mengsel van broomcresolgroen en methylrood in ethanol 96%

➤ Methode

Stap 1:

Stalen afwegen op 1,00...gr nauwkeurig in analytische balans. Elk staal afzonderlijk in een glazen destructiebuis brengen in houder (uithaalbaar bij destructietoestel onder de dampkap).

Stap 2:

2 katalisatortabletten toevoegen aan elke buis: 1x 1000 KJELTABS CX (blauwe markering) en 1x 1000 KJELTABS S (gele markering). Deze tabletten moeten met handschoenen worden genomen. Ten slotte nog 20ml zwavelzuur toevoegen aan elke buis voor deze in het destructieapparaat te plaatsen.

Stap 3:

Alle destructiebuisen, in de houder, in het destructieapparaat plaatsen gedurende 1u bij $420^\circ C$. Dit apparaat staat onder de trekkast voor extra veiligheid voor de gevaarlijke gassen. Het gevormde gas zal door het NaOH en H_2O geleid worden waardoor deze stoffen zuurder worden. Dit is het destrueren.

Na 1u, 10min laten afkoelen.

Stap 4:

Daarna worden de destructiebuisen één voor één in het destillatietoestel geplaatst waar 80ml demiwater en 50ml NaOH (33%) aan de oplossing worden toegevoegd. Het destillatietoestel zorgt voor een stoomdestillatie waarbij ammoniak wordt uitgedreven en opgevangen in 25ml boorzuoroplossing. Ten slotte wordt de oplossing in het toestel

getitreerd met H_2SO_4 0,5 M tot kleuromslag van de mengindicator. Deze laatste begint van zodra de vloeistof in de destructiebuis kookt.

➤ **Besluit**

Door het volume van zwavelzuur te vermenigvuldigen met het aantal mol zwavelzuur per liter met de relatieve molmassa van stikstof met de Kjeldahl eiwitfactor en deze dan te delen door de massa van het monster en ten slotte te vermenigvuldigen met 100 kan het percentage aan ruw eiwit worden berekend.

$$\% \text{ eiwit} = ((V \times M_1 \times M_2 \times 6,25) / M) \times 100$$

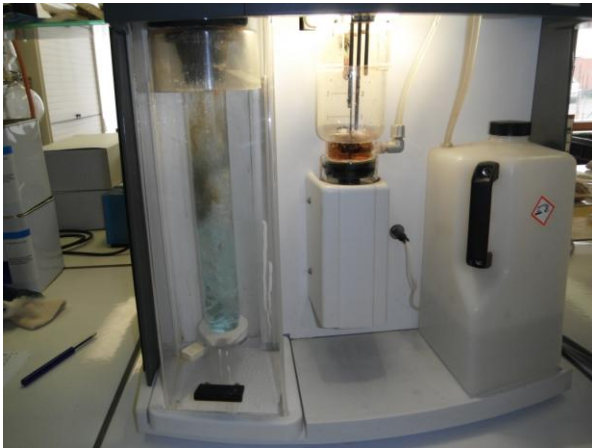
$M_1 = 0,5 \text{ mol/l}$

$M_2 = 14,01 \text{ g/mol}$ = relatieve molmassa van stikstof

M = massa monster

V = volume zwavelzuur 0,5 M verbruikt tijdens de titratie

6,25 = Kjeldahl eiwitfactor



Figuur 15: Destillatietoestel voor eiwitanalyse, met destructiebuis bij kleuromslag

4.9 Bepaling van het zetmeelgehalte

➤ Doel

Met behulp van dit protocol wordt het zetmeelgehalte in de voederstalen bepaald.

➤ Materiaal

- ✓ Analytische balans
- ✓ Voederstaal
- ✓ Hydrochloridezuur HCl 0,309mol/l
- ✓ Kokend waterbad
- ✓ Kokend waterbad met koelers
- ✓ Koudwaterbad
- ✓ Demiwater
- ✓ Carrez A en B
- ✓ Filterpapier
- ✓ Trechters
- ✓ Kleine maatbekers
- ✓ Polarimeter
- ✓ Ethanol C₂H₆O 40%
- ✓ HCl 25%
- ✓ Erlenmeyers (250ml)
- ✓ Maatkolven (100ml)
- ✓ Pipet (50ml) + peer

➤ Methode

Stap 1:

Er wordt een reeks voederstalen afgewogen, op de analytische balans, van 2,50..gr/voeder. Deze stalen worden in een maatkolf van 100ml gebracht en gemerkt als P.

Stap 2:

Aan elk voederstaal wordt er 50ml hydrochloridezuur 0,309 mol/l toegevoegd.

Stap 3:

Vervolgens wordt er 20 ml koud demiwater (vanuit de frigo) aan het mengsel toegevoegd alsook 5ml van carrez A en carrez B. Deze mengsels worden dan gehomogeniseerd waarna ze worden gefiltreerd.

Stap 4:

Ten slotte wordt de gefilterde oplossing gemeten met de polarimeter.

Stap 5:

Van elk voederstaal wordt er 5,00..gr afgewogen en in een maatkolf van 100ml gebracht.

Stap 6:

Aan elk voederstaal wordt er 60ml ethanol 40% toegevoegd. Dit wordt gedurende 30 minuten geschud op het schudtoestel.

Stap 7:

Daarna wordt het mengsel aangevuld met ethanol 40% tot aan de eikstreep en wordt gehomogeniseerd.

Stap 8:

Vervolgens wordt de oplossing gefiltreerd.

Stap 9:

Van de gefiltreerde oplossing wordt er 50ml in een erlenmeyer gebracht van 250ml en wordt er 2,1ml HCl 25% aan toegevoegd.

Stap 10:

Deze oplossing wordt weer gehomogeniseerd en wordt vervolgens in een kokend waterbad gebracht met een koeler erop, voor 15 minuten.

Stap 11:

Hierna worden de erlenmeyers afgekoeld en wordt de oplossing overgebracht in een maatkolf van 100ml waaraan 5ml carrez A en carrez B wordt toegevoegd.

Stap 11:

Deze oplossing wordt weer gehomogeniseerd en gefilterd.

Stap 12:

Ten slotte wordt de gefilterde oplossing weer gemeten met de polarimeter.

➤ Besluit

De resultaten worden uitgedrukt in de vorm van lichtabsorptie. Dus de hoeveelheid licht dat de verkregen zetmeeloplossing doorlaat. Met deze resultaten wordt dan, via de computer, automatisch het gehalte aan zetmeel berekend in g/kg.



Figuur 16: Kokend waterbad met terugvloeiakoeler

Hiernaast wordt ook nog een analyse gemaakt van de sporenelementen en mineralen voor de 4 verschillende voeders.

Werkzaamheden niet in functie van je eindwerk

- Klasseren van dossiers:

Administratief werk moest ook gebeuren. Hierbij moesten er dossiers geordend worden volgens oplopend nummer in bijhorende mappen die volgens jaartal werden geklasseerd.

- Stickers plakken:

Kleine voederpotjes die naar de boeren gestuurd worden, worden beplakt met stickers van het bedrijf. Deze moesten zo nauwkeurig mogelijk worden aangebracht op de potjes, voor het lange behoud van de stickers.

- Kippenvoerders maken:

Naast het maken van varkensvoeder werd er ook kippenvoeder gemaakt voor andere proeven. Deze voeders worden op dezelfde lange manier gemaakt als deze van bij de varkens.

- Kippen wegen:

Naast dierenproeven met varkens, worden er ook dierenproeven (i.v.m. voeders) met kippen uitgevoerd op het bedrijf. Op het einde van deze proeven moeten de kippen, net zoals bij de varkens, allemaal individueel gewogen. Hier wordt wel een onderscheid gemaakt tussen hennen en hanen en de verschillende voeders die werden gegeven. De dieren zitten per geslacht en per voeder verdeeld over de proef. De resultaten worden genoteerd en verwerkt (net zoals bij de varkens).

5 Resultaten

5.1 Dierenproef

5.1.1 Prestaties

In onderstaande tabellen 1 en 2 worden de resultaten van de prestaties van de dieren weergegeven i.v.m. de dagelijkse groei (g/d), de voederopname (g/d) en de voederconversie (gram voeder/gram dier) na respectievelijk 2 weken in de proef en van 2 tot 4 weken in de proef.

Tabel 1: Prestaties i.v.m. dagelijkse groei, voederopname en voederconversie tot 2 weken

Periode 0 – 2 weken	Dagelijkse groei (g/d)	Voederopname (g/d)	Voederconversie (g/g)
Voeder E	228.7 ± 22.1	316.7 ± 57.1	1.38 ± 0.14
Voeder F	206.6 ± 21.9	319.5 ± 35.2	1.56 ± 0.22
Voeder G	208.4 ± 42.2	310.6 ± 65.2	1.49 ± 0.06
Voeder H	222.5 ± 30.9	322.2 ± 43.7	1.45 ± 0.08

Tabel 2: Prestaties i.v.m. dagelijkse groei, voederopname en voederconversie van 2 tot 4 weken

Periode 2 – 4 weken	Dagelijkse groei (g/d)	Voederopname (g/d)	Voederconversie (g/g)
Voeder E	486.5 ± 54.6	763.4 ± 68.3	1.57 ± 0.05
Voeder F	437.3 ± 17.9	677.4 ± 28.0	1.55 ± 0.09
Voeder G	446.4 ± 27.3	697.8 ± 44.9	1.56 ± 0.03
Voeder H	421.0 ± 46.4	871.8 ± 64.1	1.60 ± 0.08

5.1.2 Microbiologie

In onderstaande tabellen 3 t.e.m. 5 worden de resultaten gepresenteerd van de microbiologische analyse die werd uitgevoerd op de maag, het illeum en de dikke darm. Hierbij werd er geanalyseerd op melkzuurbacteriën (MRS), op Enterobacteriaceae (VRBG) en op E. Coli (COLI). Dit werd gedaan voor de 4 verschillende voeders (E,F,G en H). Deze waarden worden uitgedrukt in KVE/g (KVE: Kolonie Vormende Eenheden = aantal bacteriën/g darminhoud).

Tabel 3: Resultaten microbiologie van de maag (M), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (M1-M3: Voeder E, M4-M6: voeder F, M7-M9: voeder G, M10-M12: voeder H)

	M1	M2	M3	gemiddelde
MRS	1,06 10 ³	8,00 10 ⁵	6,30 10 ⁶	2,37 10 ⁶
VRBG	0	0	0	0
COLI	0	0	0	0

M4	M5	M6	gemiddelde
6,70 10 ⁶	3,50 10 ⁶	1,50 10 ⁶	3,90 10 ⁶
0	20	0	6,67
0	0	0	0

	M7	M8	M9	gemiddelde
MRS	2,90 10 ⁶	2,90 10 ⁶	8,00 10 ⁵	2,20 10 ⁶
VRBG	0	0	0	0
COLI	0	0	0	0

M10	M11	M12	gemiddelde
1,19 10 ⁷	1,60 10 ⁶	1,90 10 ⁶	5,13 10 ⁶
0	0	10	3,33
0	0	0	0

Tabel 4: Resultaten microbiologie van het illeum (I), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (I1-I3: Voeder E, I4-I6: voeder F, I7-I9: voeder G, I10-I12: voeder H)

	I1	I2	I3	gemiddelde
MRS	$9,00 \cdot 10^3$	$1,30 \cdot 10^8$	$3,60 \cdot 10^7$	$5,53 \cdot 10^7$
VRBG	60	470	2520	1016,67
COLI	40	1050	970	686,67

I4	I5	I6	gemiddelde
$4,90 \cdot 10^7$	$1,42 \cdot 10^8$	$4,50 \cdot 10^7$	$7,87 \cdot 10^7$
150	70	930	383,33
10	90	260	120

	I7	I8	I9	gemiddelde
MRS	$3,20 \cdot 10^7$	$8,60 \cdot 10^7$	$1,40 \cdot 10^8$	$8,60 \cdot 10^7$
VRBG	0	10	500	170
COLI	10	0	610	206,67

I10	I11	I12	gemiddelde
$2,00 \cdot 10^7$	$3,30 \cdot 10^7$	$8,40 \cdot 10^7$	$4,57 \cdot 10^7$
20	$4,70 \cdot 10^6$	$1,10 \cdot 10^4$	$1,57 \cdot 10^6$
30	$4,80 \cdot 10^6$	$8,00 \cdot 10^3$	$1,60 \cdot 10^6$

Tabel 5: Resultaten microbiologie van de dikke darm (DD), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (DD1-DD3: Voeder E, DD4-DD6: voeder F, DD7-DD9: voeder G, DD10-DD12: voeder H)

	DD1	DD2	DD3	gemiddelde
MRS	$1,40 \cdot 10^6$	$1,27 \cdot 10^8$	$3,90 \cdot 10^7$	$5,58 \cdot 10^7$
VRBG	$5,40 \cdot 10^4$	$5,40 \cdot 10^4$	$6,00 \cdot 10^3$	$3,80 \cdot 10^4$
COLI	$3,30 \cdot 10^4$	$2,60 \cdot 10^4$	$7,00 \cdot 10^3$	$2,20 \cdot 10^4$

DD4	DD5	DD6	gemiddelde
$2,03 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$	$2,60 \cdot 10^7$	$1,43 \cdot 10^8$
$1,40 \cdot 10^4$	$4,10 \cdot 10^4$	$3,40 \cdot 10^6$	$1,15 \cdot 10^6$
$8,00 \cdot 10^3$	$3,80 \cdot 10^4$	$2,90 \cdot 10^6$	$9,82 \cdot 10^5$

	DD7	DD8	DD9	gemiddelde
MRS	$3,10 \cdot 10^7$	$1,23 \cdot 10^8$	$2,50 \cdot 10^8$	$1,35 \cdot 10^8$
VRBG	$5,00 \cdot 10^5$	$9,00 \cdot 10^5$	$8,00 \cdot 10^5$	$7,33 \cdot 10^5$
COLI	$3,01 \cdot 10^5$	$1,11 \cdot 10^3$	$9,00 \cdot 10^5$	$4,01 \cdot 10^5$

DD10	DD11	DD12	gemiddelde
$8,90 \cdot 10^7$	$1,18 \cdot 10^8$	$1,80 \cdot 10^7$	$7,50 \cdot 10^7$
$3,60 \cdot 10^4$	$6,00 \cdot 10^5$	$8,00 \cdot 10^3$	$2,15 \cdot 10^5$
$2,70 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^3$	$3,44 \cdot 10^5$

Van deze resultaten werd vervolgens telkens het logaritme (\log_{10} = decimaal logaritme) berekend in Excel.

Tabel 6: Logaritme van de resultaten microbiologie van de maag (M), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (M1-M3: Voeder E, M4-M6: voeder F, M7-M9: voeder G, M10-M12: voeder H), uitgedrukt in aantal bacteriën/gram darminhoud

	M1	M2	M3	gemiddelde
MRS	3,03	5,90	6,80	5,24
VRBG	0	0	0	0
COLI	0	0	0	0

M4	M5	M6	gemiddelde
6,83	6,54	6,18	6,52
0	1,30	0	0,43
0	0	0	0

	M7	M8	M9	gemiddelde
MRS	6,46	6,46	5,90	6,28
VRBG	0	0	0	0
COLI	1	0	0	0,33

M10	M11	M12	gemiddelde
7,08	6,20	6,28	6,52
0	0	1	0,33
0	0	0	0

Tabel 7: Logaritme van de resultaten microbiologie van het illeum (I), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (I1-I3: Voeder E, I4-I6: voeder F, I7-I9: voeder G, I10-I12: voeder H), uitgedrukt in aantal bacteriën/gram darminhoud

	I1	I2	I3	gemiddelde	I4	I5	I6	gemiddelde
MRS	3,95	8,11	7,56	6,54	7,69	8,15	7,65	7,83
VRBG	1,78	2,67	3,40	2,62	2,18	1,85	2,97	2,33
COLI	1,60	3,02	2,99	2,54	1	1,95	2,42	1,79

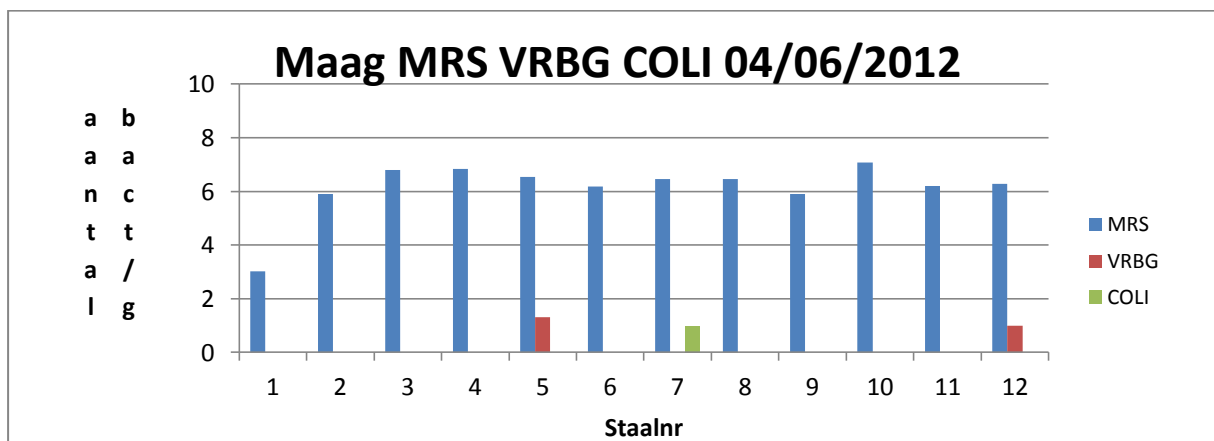
	I7	I8	I9	gemiddelde	I10	I11	I12	gemiddelde
MRS	7,51	7,94	8,15	7,86	7,30	7,52	7,92	7,58
VRBG	0	1	2,70	1,23	1,30	6,67	4,04	4,01
COLI	1	0	2,79	1,26	1,48	6,68	3,90	4,02

Tabel 8: Logaritme van de resultaten microbiologie van de dikke darm (DD), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (DD1-DD3: Voeder E, DD4-DD6: voeder F, DD7-DD9: voeder G, DD10-DD12: voeder H), uitgedrukt in aantal bacteriën/gram darminhoud

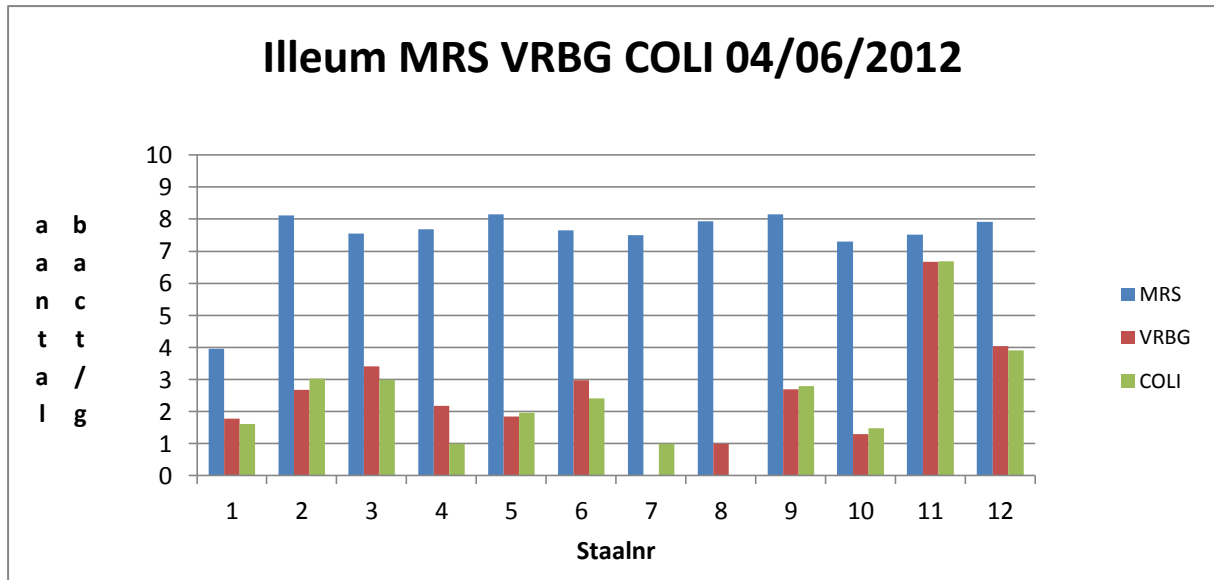
	DD1	DD2	DD3	gemiddelde	DD4	DD5	DD6	gemiddelde
MRS	6,15	8,10	7,59	7,28	8,31	8,30	7,42	8,01
VRBG	4,73	4,73	3,78	4,41	4,15	4,61	6,53	5,10
COLI	4,52	4,42	3,85	4,26	3,90	4,58	6,46	4,98

	DD7	DD8	DD9	gemiddelde	DD10	DD11	DD12	gemiddelde
MRS	7,49	8,09	8,40	7,99	7,95	8,07	7,26	7,76
VRBG	5,70	5,95	5,90	5,85	4,56	5,78	3,90	4,75
COLI	5,48	3,05	5,95	4,83	4,43	6	3,60	4,68

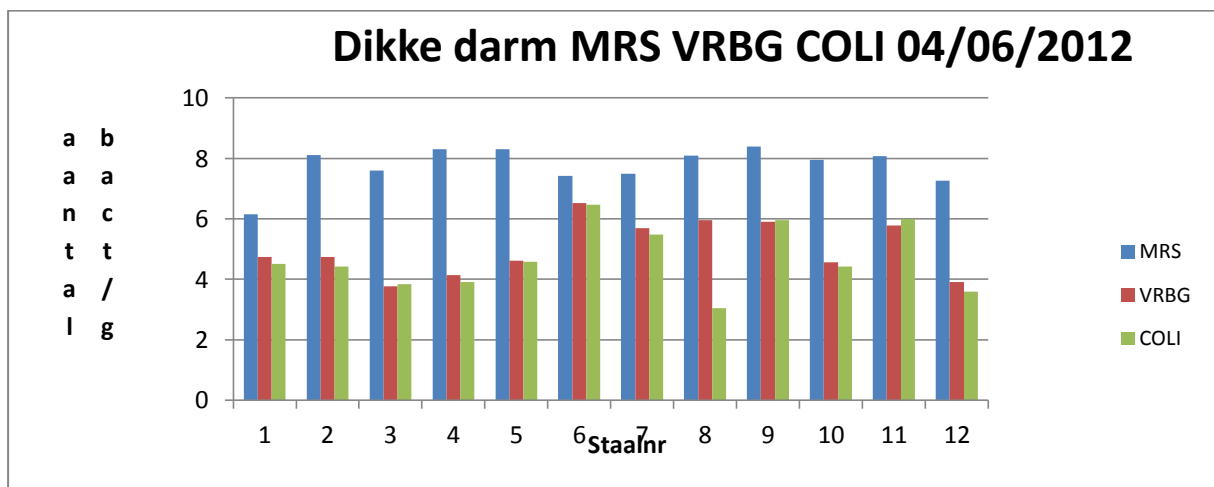
In onderstaande grafieken 2, 3 en 4 worden deze logaritmen schematisch voorgesteld.



Grafiek 2: Logaritmische resultaten van microbiologische analyse van de maag, MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (1-3: voeder E, 4-6: voeder F, 7-9: voeder G, 10-12: voeder H)



Grafiek 3: Logaritmische resultaten van microbiologische analyse van het ileum, MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (1-3: voeder E, 4-6: voeder F, 7-9: voeder G, 10-12: voeder H)



Grafiek 4: Logaritmische resultaten van microbiologische analyse van de dikke darm, MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (1-3: voeder E, 4-6: voeder F, 7-9: voeder G, 10-12: voeder H)

5.1.3 Sporen en mineralen

In onderstaande tabellen 9, 10, 11 en 12 worden de resultaten van de analyse op sporen en mineralen weergegeven alsook de netto energie en metaboliseerbare energie voor de 4 verschillende voeders.

Tabel 9: Resultaten van de analyse op sporen en mineralen met netto energie en metaboliseerbare energie voor voeder E

Element	Waarde	Eenheid
Ca	7,26	g/kg
P	5,39	g/kg
Na	3,05	g/kg
Zn	141,00	mg/kg
Mn	111,00	mg/kg
Fe	393,00	mg/kg
Cu	149,00	mg/kg
Netto Energie Varkens	2 403,17	kcal
MEvr: Metaboliseerbare energie varkens	13,59	MJ/kg

Tabel 10: Resultaten van de analyse op sporen en mineralen met netto energie en metaboliseerbare energie voor voeder F

Element	Waarde	Eenheid
Ca	6,52	g/kg
P	5,13	g/kg
Na	2,63	g/kg
Zn	122,00	mg/kg
Mn	99,00	mg/kg
Fe	345,00	mg/kg
Cu	162,00	mg/kg
Netto Energie Varkens	2 378,86	kcal
MEvr: Metaboliseerbare energie varkens	13,45	MJ/kg

Tabel 11: Resultaten van de analyse op sporen en mineralen met netto energie en metaboliseerbare energie voor voeder G

Element	Waarde	Eenheid
Ca	6,94	g/kg
P	5,18	g/kg
Na	2,69	g/kg
Zn	151,00	mg/kg
Mn	110,00	mg/kg
Fe	377,00	mg/kg
Cu	168,00	mg/kg
Netto Energie Varkens	2 367,02	kcal
MEvr: Metaboliseerbare energie varkens	12,38	MJ/kg

Tabel 12: Resultaten van de analyse op sporen en mineralen met netto energie en metaboliseerbare energie voor voeder H

Element	Waarde	Eenheid
Ca	6,34	g/kg
P	5,01	g/kg
Na	2,54	g/kg
Zn	140,00	mg/kg
Mn	111,00	mg/kg
Fe	356,00	mg/kg
Cu	142,00	mg/kg
Netto Energie Varkens	2 381,19	kcal
MEvr: Metaboliseerbare energie varkens	13,46	MJ/kg

5.2 Enzymassay

- **Enzymactiviteit voor toevoegen aan voeder:**

Voor het gemaakte enzym aan het voeder wordt toegevoegd moet worden nagegaan of er wel activiteit in zit. In onderstaande tabel 13 wordt de hoeveelheid fermentatiemedium weergegeven die werd gebruikt in de proef in overeenstemming met het proefbuisnummer waarmee werd gewerkt. Er werd enzym gekweekt over 4 verschillende erlenmeyers:

1 = gekweekt enzym op vloeibaar substraat

2M = gekweekt enzym op vloeibaar substraat waarbij de activiteit berekend werd met toevoegen van activator

2Z = gekweekt enzym op vloeibaar substraat waarbij de activiteit berekend werd zonder toevoegen van activator

3 = idem 1

3p = gekweekt enzym op vloeibaar substraat waarbij de activiteit berekend werd na presipitatie van het enzym

4 = idem 1

He = positieve controle

Tabel 13: Gegevens, enzymactiviteit voor toevoegen aan voeder

Nr. erlenmeyer	Nr.	LBG (3,00..gr)
1	1	3,0042
	2	3,0020
2M	3	3,0081
	4	3,0067
2Z	5	3,0089
	6	3,0078
3	7	3,0012
	8	3,0041
3p	9	3,0059
	10	3,0033
4	11	3,0047
	12	3,0081
He	13	3,0052
	14	3,0073

Tabel 14 en 15 geven weer wat de golflengte is die door de vloeistof (= ABS = absorptie) gaat per proefbuis, na de behandeling met DNS (3,5-dinitrosalicylic acid (phenol)). De vloeistoffen van reeks 1 waren lichter van kleur dan deze van reeks 2.

Tabel 14: Waarden fotospectrometer, reeks1

Nr. erlenmeyer	Nr.	ABS
1	1	0,111
	2	0,159
2M	3	0,277
	4	0,313
2Z	5	0,532
	6	0,499
3	7	0,151
	8	0,160
3p	9	0,044
	10	0,049
4	11	0,402
	12	0,363
He	13	0,062
	14	0,072

Tabel 15: Waarden fotospectrometer, reeks2

Nr. erlenmeyer	Nr.	ABS
1	1	0,781
	2	0,894
2M	3	1,046
	4	1,143
2Z	5	1,407
	6	1,435
3	7	0,566
	8	0,609
3p	9	0,499
	10	0,519
4	11	1,141
	12	1,069
He	13	1,604
	14	1,659

Tabel 16 geeft weer wat het verschil in lichtdoorlaatbaarheid is tussen reeks 1 en reeks 2. Deze werd manueel berekend door de waarden van reeks 1 af te trekken met de overeenkomstige waarden van reeks 2. Dit verschil is de maat waarin de enzymactiviteit wordt weergegeven.

Tabel 16: Verschil berekend tussen reeks 1 en reeks 2

Nr. erlenmeyer	Nr.	≠ ABS
1	1	0,670
	2	0,735
2M	3	0,769
	4	0,830
2Z	5	0,875
	6	0,936
3	7	0,415
	8	0,449
3p	9	0,455
	10	0,470
4	11	0,739
	12	0,706
He	13	1,542
	14	1,587

- **Enzymactiviteit na toevoegen aan voeder:**

Om te weten of het enzym zijn activiteit heeft behouden na het toevoegen aan het voeder, wordt deze berekend uitgaande van het samengestelde voeder. Tabel 17 en 18 geven enkele gegevens die van toepassing waren tijdens het berekenen.

Tabel 17: Gegevens, enzymactiviteit na toevoegen aan voeder

Voeder	Administratief nr.	Nr.	Gewicht (5,00..gr)	Soja (2,00..gr)
E	K0936	1	5,0018	2,0013
F	K0937	2	5,0077	2,0017
G	K0938	3	5,0043	2,0020
H	K0939	4	5,0049	2,0058

Tabel 18: Gegevens, enzymactiviteit na toevoegen aan voeder

Voeder	Nr.	LBG (3,00..gr)
E	1	3,0050
	2	3,0048
F	3	3,0011
	4	3,0085
G	5	3,0078
	6	3,0037
H	7	3,0079
	8	3,0087

Tabel 19: Waarden fotospectrometer, reeks1

Voeder	Nr.	ABS
E	1	1,123
	2	1,007
F	3	0,687
	4	0,617
G	5	0,595
	6	0,660
H	7	0,720
	8	0,719

Tabel 20: Waarden fotospectrometer, reeks2

Voeder	Nr.	ABS
E	1	1,426
	2	1,171
F	3	0,911
	4	0,930
G	5	0,954
	6	0,956
H	7	0,987
	8	0,882

Tabel 21: Verschil berekend tussen reeks 1 en reeks 2

Voeder	Nr.	≠ ABS
E	1	0,303
	2	0,164
F	3	0,224
	4	0,313
G	5	0,359
	6	0,295
H	7	0,267
	8	0,163

Tabel 19 en 20 geven weer wat de golflengte is die door de vloeistof gaat per proefbuis, na de behandeling met DNS. De vloeistoffen van reeks 1 waren lichter van kleur dan deze van reeks 2.

Tabel 21 geeft weer wat het verschil in lichtdoorlaatbaarheid is tussen reeks 1 en reeks 2. Deze werd manueel berekend door de waarden van reeks 1 af te trekken van de overeenkomstige waarden van reeks 2.

5.3 Ruw vetgehalte

In onderstaande tabel 22 worden de gegevens weergegeven waarmee werd gewerkt tijdens de proef en het resultaat van de analyse.

Tabel 22: Gegevens + resultaat, ruw vet

Nr.	Adm. Nr.	Voeder	Gewicht staal	Gewicht lege pot	Pot + vet	% vet	g/kg
1	K0936	E	3,0070	45,2022	45,3388	4,54	45,43
2	K0937	F	3,0051	46,5628	46,7020	4,63	46,32
3	K0938	G	3,0082	45,5574	45,6986	4,69	46,94
4	K0939	H	3,0046	46,6809	46,8218	4,69	46,89

De norm van het gehalte aan ruw vet is voor dit basisvoeder 50,836 g/kg.

5.4 Gehalte aan ruwe celstof

Tabel 23 geeft de gegevens weer waarmee werd gewerkt tijdens de proef en het resultaat van de analyse.

Tabel 23: Gegevens + resultaat, ruwe celstof (DS=droge stof)

Voeder	Gewicht staal	Nr. kroesje	Na DS (105°C)	Na verassen (485°C)	g/kg
E	1,0028	022	30,6211	30,5929	28,12
F	1,0040	496	29,8522	29,8197	32,37
G	1,0047	474	30,6388	30,6056	33,04
H	1,0070	475	30,1886	30,1589	29,75

De norm van het gehalte aan ruwe celstof is voor dit basisvoeder 37,274 g/kg.

5.5 Suikergehalte

In onderstaande tabel 24 worden de gegevens weergegeven waarmee werd gewerkt tijdens de proef en het resultaat van de analyse. Het aantal ml natriumthiosulfaat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) is de hoeveelheid die nodig was bij de titratie tot verkleuring optrad.

Tabel 24: Gegevens + resultaat, suiker

Nr. (maatkolf)	Voeder	Gewicht staal	ml natriumthiosulfaat (0,1 mol/l)	g/kg
1	E	2,5037	17,5	65,64
2	F	2,5051	17,3	70,37
3	G	2,5026	17,4	68,05
4	H	2,5070	17,5	65,56

De norm van het gehalte aan suiker is voor dit basisvoeder 53,224 g/kg.

5.6 Gehalte aan ruw eiwit

Tabel 25 geeft de gegevens weer waarmee werd gewerkt tijdens de proef en het resultaat van de analyse. Het aantal ml H₂SO₄ is de hoeveelheid die nodig was bij de titratie tot verkleuring optrad.

Tabel 25: Gegevens + resultaat, ruw eiwit

Nr.	Voeder	Adm. Nr.	Gewicht staal	ml H ₂ SO ₄	g/kg
17	E	K0936	1,0062	3,91	167,41
18	F	K0937	1,0059	3,87	165,75
19	G	K0938	1,0032	3,87	166,20
20	H	K0939	1,0071	3,91	167,26

De norm van het gehalte aan ruw eiwit is voor dit basisvoeder 164,213 g/kg.

5.7 Vochtgehalte

In onderstaande tabel 26 worden de gegevens weergegeven waarmee werd gewerkt tijdens de proef en het resultaat van de analyse. De gewichten van de potjes en de voederstalen werden digitaal bijgehouden en uitgerekend.

Tabel 26: Gegevens + resultaat

Nr.	Adm. Nr.	Voeder	g/kg
14	K0936	E	110,6
15	K0937	F	109,7
16	K0938	G	109,3
17	K0939	H	108,8

De norm van het gehalte aan vocht is voor dit basisvoeder 115,622 g/kg.

5.8 Zetmeelgehalte

In deze tabel 27 worden de gegevens weergegeven die werden gebruikt tijdens de proef en het resultaat van de analyse. Deze analyse gebeurt op basis van lichtdoorlaatbaarheid van de oplossingen die werden bereid met de voeders.

Tabel 27: Gegevens + resultaat, zetmeel

Voeder	Nr.	P	P'	Lichtintensiteit P	Lichtintensiteit P'	g/kg
K0936	1	2,5015	5,0025	4,00	0,30	400,84
K0937	2	2,5026	5,0033	3,90	0,45	373,58
K0938	3	2,5061	5,0012	3,85	0,45	367,56
K0939	4	2,5081	5,0019	3,90	0,45	372,64

De norm van het gehalte aan zetmeel is voor dit basisvoeder 395,826 g/kg.

6 Discussie en algemeen besluit

Bij de **dierenproef** werd er verwacht dat voeder E de slechtste resultaten zou voortbrengen en voeder G de beste resultaten. De resultaten van de voeders F en H zouden er tussenin zitten.

Bij de **prestaties** wordt er gezien dat voeder E voor de *dagelijkse groei* het hoogst scoort voor zowel week 0 tot 2 en van week 2 tot 4. De laagste score wordt behaald door voeder F voor 0 tot 2 weken en voeder H voor de periode van 2 tot 4 weken. Voor de *voederopname* scoort voeder H het hoogst voor zowel week 0 tot 2 als week 2 tot 4. De laagste voederopname is voor voeder G tijdens week 0 tot 2 en voor voeder F tijdens week 2 tot 4. Voeder F scoort het hoogst voor de *voederconversie* tijdens week 0 tot 2 en voeder H voor week 2 tot 4.

Bij de **microbiologische analyse** moeten de waarden van Enterobacteriaceae (VRBG) en E. Coli zo laag mogelijk liggen omdat ze een model zijn voor de pathogene flora in het maagdarmkanaal, de waarden voor de melkzuurbacterie moeten zo hoog mogelijk liggen. In de maag zijn er zo goed als geen VRBG en E. Coli's gevonden. In het illeum en de dikke darm wordt er meer VRBG en E. Coli gezien, bij de dikke darm liggen deze waarden het hoogst, maar voor al deze gastrolintestinale organen (maag, illeum en dikke darm) liggen deze waarden nooit hoger dan deze voor de melkzuurbacterie. Ook deze is het frequentst aanwezig in illeum en dikke darm.

De resultaten van de **sporen en mineralen** liggen voor de 4 verschillende voeders zeer dicht bij elkaar. Deze zitten dan ook allemaal met een zelfde hoeveelheid in het basisvoeder.

Ziekte en weersomstandigheden kunnen de resultaten beïnvloeden. Deze proef zal in de toekomst nog worden herdaan.

Doordat de **enzymactiviteit, voor het toevoegen** aan het voeder, overal hoger is dan 0,3 is er duidelijk activiteit te zien en kunnen alle enzymbereidingen gebruikt worden voor het voeder. Zo is voeder E het basisvoeder zonder toegevoegd enzym, voeder F is het basisenzym met 104 ml toegevoegd enzym, voeder G is het basisvoeder met een dubbele concentratie aan toegevoegd enzym nl. 208 ml en voeder H is het basisvoeder met de positieve controle.

Bij de berekeningen van de **enzymactiviteit na het toegevoegd** te hebben aan het voeder is duidelijk te zien dat deze veel lager ligt, maar doordat er toch een verschil is wil dit zeggen dat het enzym nog altijd actief aanwezig is in het voeder, wat een positief resultaat geeft.

Uit het resultaat van de berekening van het **ruw vetgehalte** kan gelezen worden dat er een vetgehalte aanwezig is van 45-47 g/kg, in het voeder. De norm die werd opgelegd voor het vetgehalte van dit voeder was 50 g/kg. Deze waarden liggen zeer dicht bij elkaar en geven dus weer een positief resultaat.

Bij de waarden van de **ruwe celstof** wordt er een resultaat gegeven van 28-33 g/kg ruwe celstof. De norm die voor dit component werd opgelegd was 37 g/kg. Ook deze waarden liggen weer dicht bij elkaar en vormen een positief resultaat.

Uit de waarden van tabel 12 kan er bij de resultaten een **suikergehalte** worden gezien van 65-70 g/kg. De norm voor dit component was echter een gehalte van 53 g/kg. Deze waarden liggen dus te hoog in vergelijking met de norm. Een verklaring hiervoor kan zijn dat het zetmeel in het voeder heeft meegereageerd als suiker tijdens de berekening. Hierdoor zal er additioneel nog de zetmeelbepaling worden uitgevoerd.

Wanneer de analyseresultaten worden bekeken van het **zetmeelgehalte**, in het basisvoeder, dan wordt er gezien dat er tussen de 400 en 367 g/kg zetmeel aanwezig is. Dit komt ook weer ongeveer overeen met de vooropgestelde norm voor het zetmeelgehalte in dit voeder. Dus ook voor deze waarde is er een positief resultaat.

Als resultaat bij de berekeningen van **ruw eiwit** is er een waarde verkregen van 165-167 g/kg. Deze waarden liggen weerom dicht bij de norm die werd opgesteld voor aspect van het voeder nl. 164 g/kg. Dit geeft weer een positief resultaat.

Voor het resultaat van het **vochtgehalte** in het voeder werd er een gewicht bekomen van 108-110 g/kg gevonden. Ook deze waarden liggen weer dicht bij de vooropgestelde norm van 115 g/kg, wat weer zorgt voor een positief resultaat.

Dit zijn slechts enkele van de analyses die kunnen uitgevoerd worden op het voeder, maar zijn wel de belangrijkste. Bijna al de resultaten komen overeen met de normen die werden opgesteld. Dit maakt het voeder compatibel met de dierproef waarvoor het voeder werd opgesteld.

Ziekte en weersomstandigheden kunnen de resultaten van deze proef beïnvloeden. Deze proef zal in de toekomst nog worden herhaald, maar voorlopig kan het effect van het gebruik van het enzym β -mannanase in veevoeding in twijfel getrokken worden als er wordt gekeken naar de dierenprestaties want uit de resultaten kan worden afgeleid dat de negatieve controle het beste voeder is.

7 Bio-ethische reflectie

7.1 Economisch standpunt

Doordat er in de voeding enzymen werden aan toegevoegd om deze te verbeteren bij de vertering is het mogelijk dat de voeding aan een hogere prijs zal worden verkocht. Maar aan de andere kant is het de bedoeling dat dit prijsverschil er terug wordt uitgehaald doordat de dieren, met dit voeder dan minder zullen moeten opnemen voor een zelfde (of betere) groei/gewichtsaanzet.

7.2 Ecologisch standpunt

Door antinutritionele factoren wordt het voeder minder goed verteerd waardoor de dieren minder stoffen kunnen opnemen in hun bloed. Hierdoor zullen ze meer voeder moeten krijgen voor een goede ontwikkeling, maar dit is minder aantrekkelijk in prijs en er moeten meer grondstoffen aangesproken worden. Door gebruik te maken van enzymen kunnen deze antinutritionele factoren weggewerkt worden, waardoor er minder voeder moet worden gegeven en kunnen minder toegankelijke resources (moeilijk afbreekbare grondstoffen) gebruikt worden in het voeder, zoals slechte soja. Er is dus geen direct effect van de enzymen op het milieu, ze zijn inert.

7.3 Sociaal/maatschappelijk standpunt

Doordat er minder voeder moet worden gegeven aan de dieren met deze aangepaste voeding, terwijl de dieren even gezond blijven, kan de prijs van het varkensvlees dat in de winkels wordt verkocht ook haalbaar blijven voor elke mens. En door het gebruik van andere grondstoffen valt de concurrentie weg met voedsel voor menselijke consumptie en biobrandstoffen.

Het gebruik van proefdieren is bij deze proef verantwoord omdat er validatie moet gebeuren bij de doeldiersoort en het product dat getest werd is een prototype product. De opbrengst van het experiment en het gebruik van proefdieren wegen tegen elkaar op want er moet via een klein aantal dieren worden gekeken of het product geen schade aanbrengt in het dier. Er worden dus een klein aantal dieren opgeofferd om volledige varkensstallen te vrijwaren tegen adverse effecten in de toekomst.

8 Publiceerbaar artikel

Titel

Aanpak van Antinutritionele Factoren in Veevoeding via Enzymen

Inleiding

Omdat de beschikbaarheid van grondstoffen van veevoeder, in de praktijk, niet altijd vanzelfsprekend is (ze worden schaars en duur) wordt er gezocht naar alternatieve grondstoffen die kunnen gebruikt worden in de veevoedingssector. Deze alternatieve grondstoffen zijn nutritioneel echter niet altijd even geschikt als voeder, vanwege de aanwezigheid van antinutritionele factoren (dit zijn factoren die de vertering in de weg staan). Een oplossing hiervoor is om deze antinutritionele factoren af te breken met behulp van enzymen die aan het voeder worden toegevoegd. In voederconcepten van varkens zullen de antinutritionele factoren worden nagegaan via de enzymwerking van bepaalde specifieke (nieuwe) prototype enzymen. Deze uitvoering gebeurt in de vorm van dierenproeven met gespeende biggen (tot 20 kg). Hierbij wordt dan de vertering in het gastro-intestinaal kanaal onderzocht in aanwezigheid van dit toegevoegde prototype enzym, *in vivo* (en *in vitro* (*ex vivo*)), voor deze verder worden uitgewerkt.

Probleemstelling

Omdat er in varkensvoeder diverse stoffen en planten worden gebruikt zal de exacte chemische samenstelling van het voeder niet altijd overeenstemmen met de eigenschappen van een goed verteerbaar voeder. Hiermee wordt een voeder bedoeld dat resulteert in verhoogde dierprestaties. Zo'n voeder wordt berekend op basis van dagelijkse groei, voederopname en voederconversie (de hoeveelheid voeder dat een dier opneemt per kg groei, deze wordt het best zo laag mogelijk gehouden). Wanneer deze resultaten slecht uitkomen, komt dit voornamelijk door de antinutritionele factoren die een goede vertering tegengaan. Men moet dus een manier vinden om de werking van deze antinutritionele factoren tot een minimum te beperken.

Door de aanwezigheid van deze antinutritionele factoren in het varkensvoeder kunnen de dieren hun voeder niet optimaal afbreken naar nutriënten die vervolgens kunnen worden opgenomen in de bloedbaan. In plaats daarvan worden ze terug uitgescheiden met de feces. Op deze manier gaat een groot deel aan nutriënten verloren, die anders hadden bijgedragen aan de ontwikkeling van het dier. Deze factoren zijn inert in het milieu en hebben geen effect hierop.

Rationale:

Om moeilijk verteerbare stoffen in voeder (veevoeding) te kunnen verteren moeten deze eerst beter verteerbaar worden gemaakt. Dit kan gebeuren op twee verschillende manieren, ofwel aan de hand van een technische behandeling; waarbij er wijzigingen gebeuren aan bv. de temperatuur of de pH van het voeder ofwel het voeder een nutritionele behandeling laten ondergaan waarbij er gebruik gemaakt wordt van enzymen. Deze laatste zal het geval zijn voor deze proef.

Concept:

Het doel van deze proef is om enzymmengsels te verkrijgen die complexe voedersubstraten kunnen afbreken of beter verteerbaar maken, waardoor de opname van het voeder bij de dieren effectiever verloopt. Op die manier kan men armere grondstoffen aanschaffen voor het voeder, waardoor de kosten lager liggen en moet er minder worden gevoederd voor een zelfde resultaat, zonder het welzijn van het dier te schaden.

Objectief:

Door gebruik te maken van dierenproeven kan er, ter controle, worden nagegaan wat de mate is van de inwerking van de toegevoegde enzymen in het voeder. De resultaten van deze dierenproeven zullen vervolgens worden berekend en uitgewerkt. De resultaten worden verkregen door het uitvoeren van enzymassays en analyses voor de nutritionele samenstelling (eiwit, vet, ruwe celstof, suikers) van het voeder.

Onderzoek

In dit onderzoek zal de activiteit van β -mannanase worden nagegaan in eiwit arm varkensvoeder.

Het experiment wordt uitgevoerd in opdracht van Oekraïne. Het voeder dat wordt gebruikt is een goed basisvoeder met uitzondering van het eiwitgehalte. Het voeder werd zo samengesteld omdat de eiwitbron van het veevoeder in Oekraïne bestaat uit slechte soja (laag eiwitgehalte). Met behulp van dit experiment kan worden nagegaan of het toevoegen van een enzym, β -mannanase, aan het voeder, het slechte eiwitgehalte kan compenseren, waardoor een goed en betaalbaar voeder wordt gecreëerd.

Er zal worden gewerkt volgens de reeds vooropgestelde protocols die in de praktijk worden gebruikt, op het bedrijf.

Voeder:

In deze proef worden er 4 verschillende voeders met elkaar vergeleken. Een basisvoeder (E), basisvoeder met 104ml enzym aan toegevoegd (F), basisvoeder met 208ml enzym (G) en basisvoeder met positieve controle (H).

Voor de enzymactiviteit wordt er gebruik gemaakt van enzymassays voor het specifieke β -mannanase. De nutritionele waarden worden berekend volgens de bijhorende protocols, dit geldt voor de bepaling van het ruw eiwitgehalte, ruwe celstofgehalte, ruw vetgehalte, suikerbepaling (volgens Luff-Schoorl), zetmeel- en vochtbepaling.

Allereerst wordt het enzym in het labo opgekweekt tot er voldoende activiteit in aanwezig is. Dit gebeurt aan de hand van micro-organismen. Wanneer er uiteindelijk voldoende enzymactiviteit is kan het aan het voeder worden toegevoegd. Als de voeders volledig bereid zijn worden hier stalen van genomen en kan men voor de belangrijkste aspecten van het voeder (enzymactiviteit, eiwit, suiker, vet en ruwe celstof) de waarden bepalen.

Dieren:

Op het einde van de proef worden slechts enkele, willekeurig gekozen, dieren geëuthanaseerd om te dissecteren uit het gastro-intestinaalkanaal. Hierbij worden dan stalen genomen van de maag-, twaalfvingerigedarm- en illeuminhoud genomen voor microbiële analyse. Voor de biochemische analyse wordt een deel van het weefsel van deze organen uitgedissecteed. In geval van de microbiële analyse wordt er gekeken naar lactobacilli, E. Coli en Enterobacteriaceae. Voor de histochemische analyse wordt er gelet op de hoogte van de villi en cryptdiepte van twaalfvingerigedarm- en iliumstalen. Ook worden er enzymassays uitgevoerd op de meststalen die werden genomen.

In dit experiment zullen er 12 dieren (van de 64) in de proef worden geëuthanaseerd en gedissecteed. Van de overige dieren wordt individueel het gewicht genoteerd en worden bij de boer opgekweekt tot ze rijp zijn voor de slacht.

Indien de waarden van alle onderzochte onderdelen binnen de normen vallen, weet men dat men een geslaagd voeder heeft.

De proeven die worden uitgevoerd op de dieren zijn het vervolg van eerder uitgevoerde proeven. Ook is er een vervolg voorzien na het uitvoeren van deze proeven.

Resultaten

Bij de dierenproef werd er verwacht dat voeder E de slechtste resultaten zou voortbrengen en voeder G de beste resultaten. Dit omdat dit het basisvoeder is zonder toevoegingen. De resultaten van de voeders F en H zouden er tussenin zitten. Uit de dierenproef lijken de resultaten van deze verwachtingen echter wat af te wijken.

De analyses die werden uitgevoerd voor dit basisvoeder zijn deze voor ruw eiwit, ruw vet, ruwe celstof, suiker, zetmeel en vocht. Bijna al de resultaten van de uitgevoerde analyses komen overeen met de normen die werden opgesteld voor dit basisvoeder.

Slot

De analyses die werden uitgevoerd op dit voeder zijn slechts enkele van de vele, maar het zijn wel de belangrijkste analyses. Omdat bijna al de resultaten overeen komen met de vooropgestelde normen is het voeder compatibel met de dierenproef waarvoor het voeder werd opgesteld.

Ziekte en weersomstandigheden kunnen de resultaten van deze proef beïnvloeden. Deze proef zal in de toekomst nog worden herhaald, maar voorlopig kan het effect van het gebruik van het enzym β -mannanase in veevoeding in twijfel getrokken worden als er wordt gekeken naar de dierenprestaties want uit de resultaten kan worden afgeleid dat de negatieve controle het beste voeder is.

Persoonlijke visie op de stage en het stagebedrijf

Voor mij was deze stage mijn eerste contact met proefdieren en de volledige opstelling van een dierenproef. Om mijn stage bij de proefdieren uit te voeren is voor mij een boeiende en interessante keuze geweest. Ook was het de eerste keer dat ik met varkens als proefdier heb gewerkt, waardoor ik veel heb bijgeleerd over het werken met deze dieren, de verzorging ervan en het toepassen van de juiste protocols bij de dierenproef. Alsook ben ik wijzer geworden in het concept diervoeding en het gebruik van verschillende additieven hierin.

Het werk was zeer gevarieerd waardoor ik in de loop van mijn stage met veel nieuwe dingen in contact ben gekomen. De sfeer zat ook zeer goed.

Bij de dieren zelf kan het werk verdeeld worden met afspraken. Er moet goed worden opgelet wat er wordt gedaan (met voeding en temperaturen) omdat deze de proef kunnen beïnvloeden. Soms is er wat materiaal te kort, maar met de juiste afspraken is dit geen probleem.

In het labo worden de analyses uitgevoerd met protocols en ieder heeft zijn eigen analyses om uit te voeren. Er moet wel optijd worden afgewassen anders is er kans dat er niet genoeg glaswerk ter beschikking is voor de analyse dat je wil uitvoeren, maar als iedereen hier rekening mee houdt en er om de beurt een vaatwas wordt gedaan is dit ook weer geen probleem.

Al bij al was dit voor mij een zeer leerrijke stage en een die ik voor de rest van mijn carrière zal bijdragen.

Bijlagen

Bijlage 1: Producten

Tabel 28: Producten - Varkens³⁷

Afdeling	Product	Kenmerk
Biggen	Babipops	Een kwaliteitskorrel die zowel voldoet aan de voedingsstrategische als de economische eisen
	Aromabiotic	Een revolutie in voedingrediënten
	Aromabiotic liquid	Een revolutie in voedingrediënten
	Vitalife	Werkt tegen uitdroging door herstel van de ionische en energiebalans
	Mycozym	Combineert de kracht van een toxinebinder en enzymen in de strijd tegen mycotoxines
	Vitaproteïn 50 plus	Rendabele vismeelvervanger die voldoet aan de hoogste kwaliteitsnormen
	Vitalacto	Mix van lactose-, vet-, eiwitbronnen en aroma's
	Vitapops	Speciaal concentraat om speenvoeder voor biggen te produceren
	Vitavit	Supplement om het afweersysteem te verbeteren
	Vitarocid	De smakelijke zuurteregelaar
	Babito	Hét snoepvoeder in meelvorm met de vroegste opname ooit
Vleesvarkens	Vitazym	Stelt de nutritionele elementen ter beschikking en bevordert de absorptie
	Salbiotic	Veilig voeder voor veilig voedsel
	Aromabiotic	Een revolutie in voedingrediënten op basis van middellange ketenvetzuren (MLKV)
	Aromabiotic liquid	Een revolutie in voedingrediënten op basis van middellange ketenvetzuren (MLKV)
	Mycozym	Combineert de kracht van een toxin-binder en enzymen in de strijd tegen mycotoxines
Drachtige zeugen	Vitaproteïn 50 plus	Rendabele vismeelvervanger die voldoet aan de hoogste kwaliteitsnormen
	Vitazym	Stelt de nutritionele elementen ter beschikking en bevordert de absorptie
	Salbiotic	Veilig voeder voor veilig voedsel op basis van middellange ketenvetzuren (MLKV)
	Aromabiotic	Een revolutie in voedingrediënten
	Aromabiotic liquid	Een revolutie in voedingrediënten
Lacterende zeugen	Mycozym	Combineert de kracht van een toxin-binder en enzymen in de strijd tegen mycotoxines
	Vitamanna	Beschermt uw zeugen tegen MMA
	Vitasowparto	Ondersteunt de zeug bij het werpen
	Salbiotic	Veilig voeder voor veilig voedsel
	Aromabiotic	Een revolutie in voedingrediënten
Lacterende zeugen	Aromabiotic liquid	Een revolutie in voedingrediënten
	Mycozym	Combineert de kracht van een toxin-binder en enzymen in de strijd tegen mycotoxines
	Vitaproteïn 50 plus	Rendabele vismeelvervanger die voldoet aan de hoogste kwaliteitsnormen
	Vitavit	Supplement om het afweersysteem te verbeteren

³⁷ http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/454258D234A7C65DC12576250038D813?opendocument

	Vitarocid Vitapunch Salbiotic	De smakelijke zuurteregelaar Van spenen tot bronst: elke dag telt Veilig voeder voor veilig voedsel
--	-------------------------------------	---

Tabel 29: Producten - Pluimvee³⁸

Afdeling	Product	Kenmerk
Vleeskippen	Vita oligo sol Mycozym Heatstop Galito Vitaproteïn 50 plus Galistart Aromabiotic Hemicell Vitazym Salbiotic Regulor	Een oplosbaar vitamine-en sporensupplement Combineert de kracht van een toxin-binder en enzymen in de strijd tegen mycotoxines Voorkom hittestress bij uw kuikens Iedereen praat over het ééndagskuiken...maar wie praat over het pasgeboren kuiken? Rendabele vismeelvervanger die voldoet aan de hoogste kwaliteitsnormen Prestarter concentraat voor vleeskippen, met inmengingspercentage van 8 tot 15% Het natuurlijk alternatief voor pluimvee Het enige in de EU geregistreerde β -mannanase Stelt de nutritionele elementen ter beschikking en bevordert de absorptie Veilig voeder voor veilig voedsel Energie booster
Leghennen en moederdieren	Aromabioticpoul 60 Vita oligo sol Heatstop Galito Vitaproteïn 50 plus Shellbiotic Galistart Vitazym Salbiotic Regulor	Het natuurlijk alternatief voor pluimvee Een oplosbaar vitamine-en sporensupplement Voorkom hittestress bij uw kuikens Iedereen praat over het ééndagskuiken...maar wie praat over het pasgeboren kuiken? Rendabele vismeelvervanger die voldoet aan de hoogste kwaliteitsnormen Voor betere eikwaliteit Prestarter concentraat voor kippen, met inmengingspercentage van 8 tot 15% Stelt de nutritionele elementen ter beschikking en bevordert de absorptie Veilig voeder voor veilig voedsel Energie booster

³⁸ http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/0E2837C424D0FDB5C12576250038E029?opendocument

Tabel 30: Producten - Rundvee³⁹

Afdeling	Product	Kenmerk
Kalveren	Aromabiotic Cattle	Een revolutie in voedingrediënten
	Aromabiotic liquid	Een revolutie in voedingrediënten
	Vobofort	Kwalitatief hoogstaande melkvervanger voor opfok- en starterkalveren, gebaseerd op afgeroomde melkpoeder (40 %)
	Vitaspray	Eén van onze recentste ontwikkelingen in melkvervangers voor opfokkalveren
	Vita calfstart	Het smakelijke startvoeder voor jonge kalveren
Vleesvee	Aromabiotic liquid	Een revolutie in voedingrediënten
	Aromabiotic Cattle	Een revolutie in voedingrediënten
	Granulor	Een smakelijk gegranuleerd mineralenkorreltje aangepast aan uw ruwvoeder en de laatste ontwikkeling in voeding voor herkauwers
	Rumariotic	Een revolutie in voedingrediënten
Melkvee	Aromabiotic Cattle	Een revolutie in voedingrediënten
	Aromabiotic liquid	Een revolutie in voedingrediënten
	Rumabiotic	Een revolutie in voedingrediënten

Bijlage 2: Specialiteiten – Varkens (doeldiersoort)

Tabel 31: Specialiteiten - Varkens⁴⁰

Product	Kenmerk
Babipops	Een kwaliteitskorrel die zowel voldoet aan de voedingsstrategische als de economische eisen
Aromabiotic	Een revolutie in voedingrediënten
Aromabiotic liquid	Een revolutie in voedingrediënten
Vitalife	Werkt tegen uitdroging door herstel van de ionische en energiebalans
Vitadys	Voeder dat zorgt voor gezonde dieren
Vitapops	Speciaal concentraat om speenvoeder voor biggen te produceren
Vitavit	Supplement om het afweersysteem te verbeteren
Salbiotic	Veilig voeder voor veilig voedsel

³⁹ <http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/ /AD220B6B8498B04EC12576250038E84A?opendocument>

⁴⁰ <http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/ /454258D234A7C65DC12576250038D813?opendocument>

Bijlage 3: Fysiologische parameters van het varken

Tabel 32: Fysiologische parameters van het varken⁴¹

Fysiologische parameter	Varken
Milieufactoren	
Temperatuur (°C)	15-36
Relatieve vochtigheid (%)	40-60
Ventilatie (m ³ /uur/dier)	100-180
Licht/donker (uren)	-
Minimale kooihoogte (m)	3
Minimale vloeroppervlak (m ²)	2-7,5
Minimale vloeroppervlak per dier (m ²)	0,2-2,5
Algemene fysiologische waarden	
Volwassen gewicht (kg):	
- Vrouwtje	150-220
- Mannetje	200-300
Levensduur (jaren)	14-18
Hartslagfrequentie (/min.)	60-90
Ademhalingsfrequentie (/min.)	8-18
Lichaamstemperatuur (°C)	38-40
Aantal chromosomen (2n)	38
Lichaamsoppervlak (cm ²)	-
Wateropname (ml/kg/dag)	50-80
Geslachtsrijp (maanden):	
- Vrouwtje	5-7
- Mannetje	5-7
Fokrijp (maanden):	
- Vrouwtje	>7
- Mannetje	>7
Oestriscie cyclus (dagen)	18-24
Oestrusduur (dagen)	1-3
Drachtigheidsduur (dagen)	110-118
Worpgrootte	11-16
Geboortegewicht (g)	900-1 600
Speengewicht (kg)	6-8
Speenleeftijd (weken)	4-8
Bloedwaarden	
Bloedvolume (ml/kg)	74
Hemoglobine (g/100ml)	13
Hematocriet (vol%)	41
Leukocyten (x1000/ml)	8-16
Glucose (mg/100ml)	60-90

⁴¹Van Zutphen et al, 2009

Bijlage 4: Gedetailleerde voedingswaarde van biggenvoerders

Tabel 33: Voedingswaarden van biggenvoerders per kg voeder (88% DS)⁴²

	Prestarter voeder (5-7 kg LG)	Speenvoeder (7-12 kg LG)	Veilig speenvoeder (7-12 kg LG)	Startervoeder (12-25 kg LG)
NE (kcal/kg)	2400	2300	2300	2300
Lysine (g)	13.8	13.8	13.8	13.1
Lys: Met/Cys: Thr: Try	1:0.53:0.63:0.18	1:0.53:0.63:0.18	1:0.53:0.63:0.18	1:0.53:0.63:0.18
Ruw eiwit (g)	190	175-185	165	170-180
Ruw vezel (g)	-	40	Min. 40	35
Ca (g)	8.5	7.5	6.5	7.5
dP (g)	3.5	3.5	3.3	3.5
P (g)	5.5	5.5	5.0	5.5
Na (g)	2.0	2.0	2.0	2.0

⁴²De Backer P. et al. (2010)

Bijlage 5: Afscheidingsproducten van het spijsverteringskanaal

Tabel 34: Afscheidingsproducten van het spijsverteringskanaal met in het bijzonder de enzymen in het spijsverteringskanaal.

Orgaan	Secretie	Type	Effect
Speekselklieren	Speekselamylase Maltase Mucine	Enzyme Enzyme Glycoproteïne	Zetmeel → maltose Maltose → glucose Bindt voedseldeeltjes samen
Maag	Gastrine HCl Pepsine (pepsinogeen) Rennine (= leb, chymosine) Maaglipase	Hormoon Anorganisch zuur Enzyme Enzyme Enzyme	Afscheiding van maagsap Pepsinogeen → pepsine/doodt bacteriën Protein → peptide Coaguleert melkeiwitten (herkauwers) (omzetting van oplosbaar caseïne in onoplosbaar paracaseïne Geëmulgeerd vet (van melk of ei) → vetzuren en glycerol
Pancreas	Trypsine (trypsinogeen) Chymotrypsine (chymotrypsinogeen) Carboxypeptidase Aminopeptidase Amylase Lipase NaHCO ₃ RNase, DNase	Enzyme Enzyme Enzyme Enzyme Enzyme Enzyme Zout Enzyme	Eiwitten en polypeptiden → kleine peptiden Chymotrypsinogeen → chymotrypsine Eiwitten en polypeptiden → kleine peptiden Polypeptiden → dipeptiden en aminozuren Polypeptiden → dipeptiden en aminozuren Zetmeel en glycogeen → maltose Vetten → vetzuren en glycerol Neutraliseert HCl Nucleïnezuren → nucleotiden
Lever	Galzouten	Steroïden	Emulgering van vetten
Dunne darm	Tri- en dipeptidasen Enterokinase Maltase Sucrase Lactase Secretine Pancreozymin Cholecystokinine	Enzymes Enzyme Enzyme Enzyme Enzyme Hormoon Hormoon Hormoon	Tri- en dipeptiden → aminozuren Trypsinogeen → trypsin Maltose → glucose Saccharose (sucrose) → glucose + fructose Lactose → glucose + galactose Secretie van NaHCO ₃ door pancreas Secretie van pancreasenzymen Ledigen galblaas

Bijlage 6: Recept basisvoeder enzymen

Tabel 35: Recept basisvoeder enzymen

Nutriënt	Naam	%	Gewicht (kg)
Suiker/zetmeel	Gerst	34,980	349,80
	Havermout (gemalen)	3,600	36,00
	Mais (ontsloten)	15,000	150,00
	Tarwe gemalen 2mm	16,728	167,280
Eiwit	Soja 49 braz	15,000	150,00
	Sojabloem 200 mu	1,800	18,000
Vet	Sojaolie	2,500	25,00
	Weivetkern 50	1,000	10,000
Enzym	Ronozyme NP10000CT	0,015	0,150
Mineralen	Zout (los)	0,440	4,400
	Monocalciumfosfaat	0,720	7,200
	Krijt fijn (bulk)	0,865	8,650
	Illiet, opgezuiverd	0,025	0,250
Mineraal / anti-micotoxyne	Bentoniet cc2	0,150	1,500
Mineralen en sporenelementen	Portracefabbaasrode	0,100	1,000
	PX koper	0,180	1,800
Vitamine	Px vit vark 3/2.5	0,113	1,130
Vitamines en sporenelementen	VT E 50% Adsorbaat	0,012	0,120
	VT chol CL 60% CCM	0,125	1,250
	VT C monofosfaat 35%	0,015	0,150
	Ijzersulf 30% mono zk	0,040	0,400
	PX BHT-Ethoxyquin	0,015	0,150
Aminozuren	DL-methioninezk	0,250	2,500
	L-lysine HClzk	0,60	6,000
	L-threoninezk	0,270	2,700
	L-tryptofaan zk	0,077	0,770
	L-valinezk	0,130	1,300
Melkproduct	Weipoeder zoet	4,000	40,00
	Lactose (monohy feed)	1,050	10,50
Aroma	AR sweetener	0,025	0,250
	AR mono-na glutamaat	0,100	1,000
	AR babigranzozoe	0,075	0,750
		100,000	1000,000

Lijst met gebruikte afkortingen

Aforting	Uitgebreid
- N.V.T	- Niet Van Toepassing
- GMP	- Good Manufacturing Practice
- HACCP	- Hazard Analysis Critical Control point
- Q&S	- Qualität und Sicherheit
- GGO	- Genetisch Gemodificeerd Organisme
- A-futter	- A-Futter
- VCR	- Voedselconversie ratio
- NEv	- Netto energie varken
- EW	- Energiewaarde
- VRE	- Verteerbaar ruw eiwit
- VRV	- Verteerbaar ruw vet
- VRC	- Ruwe celstofgehalte
- VOK	- Overige koolhydraten
- VS	- Verteerbare suikers
- ABS	- Absorptie
- TMK	- Tarwe Kort Meel
- FFI	- Functional Feed Ingredients
- N.V.	- Naamloze Vennootschap
- ABS	- Absorptie
- DNS	- 3,5-dinitrosalicylic acid (phenol)

Lijst met figuren

Figuur 1: Vestigingen Nutrition Sciences.....	11
Figuur 2: Grafische weergave van de omgekeerd evenredige relatie tussen twee.....	15
Figuur 3: Varkensmaag.....	18
Figuur 4: Darmvilli en crypten	18
Figuur 5: Dikke darm van het varken.....	19
Figuur 6: Werking enzym	23
Figuur 7: Het overzicht van 4 batterijen die uit 4 boxen bestaan in het experimentele landbouwbedrijf	26
Figuur 8: Binnenzicht van 1 batterij	26
Figuur 9: Dialysemembranen gevuld met pallet	31
Figuur 10: Verschillende componenten van het voeder worden bij elkaar gemengd.....	32
Figuur 11: Tijdens het mengen wordt het enzym aan het voeder toegedruppeld	32
Figuur 12: Warmwaterbad waarin proefbuizen met fermentatiemedium en enzym zit	34
Figuur 13: Extractieapparaat voor vet, met extractiehulzen	36
Figuur 14: Het Fibertec apparaat voor ruwe celstofanalyse, met kroesjes.....	38
Figuur 16: Destillatietoestel voor eiwitanalyse, met destructiebuis bij kleuromslag	42
Figuur 15: Kokend waterbad met terugvloeiakoeler	44

Lijst met tabellen

Tabel 1: Prestaties i.v.m. dagelijkse groei, voederopname en voederconversie tot 2 weken	46
Tabel 2: Prestaties i.v.m. dagelijkse groei, voederopname en voederconversie van 2 tot 4 weken	46
Tabel 3: Resultaten microbiologie van de maag (M), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (M1-M3: Voeder E, M4-M6: voeder F, M7-M9: voeder G, M10-M12: voeder H)	46
Tabel 4: Resultaten microbiologie van het illeum (I), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (I1-I3: Voeder E, I4-I6: voeder F, I7-I9: voeder G, I10-I12: voeder H)	47
Tabel 5: Resultaten microbiologie van de dikke darm (DD), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (DD1-DD3: Voeder E, DD4-DD6: voeder F, DD7-DD9: voeder G, DD10-DD12: voeder H)	47
Tabel 6: Logaritme van de resultaten microbiologie van de maag (M), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (M1-M3: Voeder E, M4-M6: voeder F, M7-M9: voeder G, M10-M12: voeder H), uitgedrukt in aantal bacteriën/gram darminhoud	47
Tabel 7: Logaritme van de resultaten microbiologie van het illeum (I), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (I1-I3: Voeder E, I4-I6: voeder F, I7-I9: voeder G, I10-I12: voeder H), uitgedrukt in aantal bacteriën/gram darminhoud	48
Tabel 8: Logaritme van de resultaten microbiologie van de dikke darm (DD), MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (DD1-DD3: Voeder E, DD4-DD6: voeder F, DD7-DD9: voeder G, DD10-DD12: voeder H), uitgedrukt in aantal bacteriën/gram darminhoud	48
Tabel 9: Resultaten van de analyse op sporen en mineralen met netto energie en metaboliseerbare energie voor voeder E	50
Tabel 10: Resultaten van de analyse op sporen en mineralen met netto energie en metaboliseerbare energie voor voeder F	50
Tabel 11: Resultaten van de analyse op sporen en mineralen met netto energie en metaboliseerbare energie voor voeder G	50
Tabel 12: Resultaten van de analyse op sporen en mineralen met netto energie en metaboliseerbare energie voor voeder H	50
Tabel 13: Gegevens, enzymactiviteit voor toevoegen aan voeder	51
Tabel 14: Waarden fotospectrometer, reeks1	51
Tabel 15: Waarden fotospectrometer, reeks2	51
Tabel 16: Verschil berekend tussen reeks 1 en reeks 2	52
Tabel 17: Gegevens, enzymactiviteit na toevoegen aan voeder	52
Tabel 18: Gegevens, enzymactiviteit na toevoegen aan voeder	52
Tabel 19: Waarden fotospectrometer, reeks1	52
Tabel 20: Waarden fotospectrometer, reeks2	52
Tabel 21: Verschil berekend tussen reeks 1 en reeks 2	53
Tabel 22: Gegevens + resultaat, ruw vet	53
Tabel 23: Gegevens + resultaat, ruwe celstof (DS=droge stof)	53
Tabel 24: Gegevens + resultaat, suiker	54
Tabel 25: Gegevens + resultaat, ruw eiwit	54
Tabel 26: Gegevens + resultaat	54
Tabel 27: Gegevens + resultaat, zetmeel	54
Tabel 28: Producten - Varkens	I
Tabel 29: Producten - Pluimvee	II
Tabel 30: Producten - Rundvee	III
Tabel 31: Specialiteiten - Varkens	III
Tabel 32: Fysiologische parameters van het varken	I
Tabel 33: Voedingswaarden van biggenvoerders per kg voeder (88% DS)	II

Tabel 34: Afscheidingsproducten van het spijsverteringskanaal met in het bijzonder de enzymen in het spijsverteringskanaal.....	3
Tabel 35: Recept basisvoeder enzymen	I

Lijst met grafieken

Grafiek 1: Invloed van de substraatconcentratie op de reactiesnelheid bij aanwezigheid van allosterische effecten	24
Grafiek 2: Logaritmische resultaten van microbiologische analyse van de maag, MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (1-3: voeder E, 4-6: voeder F, 7-9: voeder G, 10-12: voeder H)	48
Grafiek 3: Logaritmische resultaten van microbiologische analyse van het illeum, MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (1-3: voeder E, 4-6: voeder F, 7-9: voeder G, 10-12: voeder H)	49
Grafiek 4: Logaritmische resultaten van microbiologische analyse van de dikke darm, MRS: melkzuurbacteriën; VRBG: Enterobacteriaceae; COLI: E. Coli (1-3: voeder E, 4-6: voeder F, 7-9: voeder G, 10-12: voeder H)	49

Bronvermelding

- **Internet**

"Producten varkens", internet, Vitamex, http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/454258D234A7C65DC12576250038D813?opendocument, geraadpleegd op 20 september 2011

"Productenpluimvee", internet, Vitamex, http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/0E2837C424D0FDB5C12576250038E029?opendocument, geraadpleegd op 20 september 2011

"Productenrundvee", internet, Vitamex, http://www.vitamex.be/vitamex/ewcm.nsf/_/AD220B6B8498B04EC12576250038E84A?opendocument, geraadpleegd op 20 september 2011

I. Kristel, "Effect vetzuren in varkensvoer nog niet bewezen", 2010, <http://edepot.wur.nl/162995>, geraadpleegd op 7 februari 2012

Ir. W.L. Jansen, "Alternatieven voor antibiotica", internet, 1999, <http://site183.primosite.com/docs/Boekje%20AMGB.pdf>, geraadpleegd op 16 april 2012

GMO Compass, "Mannanase", internet, 2010, <http://www.gmo-compass.org/eng/database/enzymes/349.mannanase.html>, geraadpleegd op 19 april 2012

Anne Becker, "Salivaireprolinerijke eiwitten bij vrijgrazendezebu's als merker voor habitatdegradatie in Ethiopië", pg 18, internet, universiteit Gent, faculteit diergeneeskunde, 2009-2010, http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/460/223/RUG01-001460223_2011_0001_AC.pdf, geraadpleegd op 10 mei 2012

"Structobalans", *Voeren is maatwerk: Wetenschappelijk onderzoek van de Gezondheidsdienst voor Dieren*, De Valk Wekerom, internet, <http://www.structobalans.nl/onderzoekgd.htm>, geraadpleegd op 26 mei 2012

Lee I. Chiba, "Diet formulation and common feed ingredients", *As-fed, dry matter or air-dry*, Animal Nutrition Handbook Section 18: Diet Formulation & Feed Ingredients, pg 492, internet, pdf, <http://www.ag.auburn.edu/~chibale/an18dietformingredients.pdf>, geraadpleegd op 12 mei 2012

"Woordenboek, termen en definities over geur, stank", *enzym*, Ecodor.eu., internet, http://www.ecodor.nl/component/option.com_glossary/Itemid,670/catid,266/func.view/term,Enzym/, geraadpleegd op 26 mei 2012

- **Pdf**

"Effect of on growth performance and on microbial ecology and physiological behaviour of the intestinal tract of weaning piglets", pdf, Vitamex, 27/07/11

Christophe Decaigny, "Formulatie: voederbestanddelen", pg 4, pdf, internet, www.daphorst.nl/download.php?id=809, geraadpleegd op 12 mei 2012

- **Boeken**

De Backer P. et al., "Zakboekvarkens – Feiten, data, cijfers", SCS BoehringerIngelheimComm.V., AfdelingVetmedica, 2010, pg 31

Engbersen J.F.J. en De Groot AE., "Inleiding in de bio-organischechemie", Wageningen Pers, Wageningen, Nederland, ISBN 90-74134-21-1, 1995, pg 435-447

Fokkinga A. en Marleen Felijs A., "Hetvarkensboek", THOTH, Bussum, Nederland, ISBN 90 6868 373 x, 2004, pg 108

Van Zutphen et al, "Handboekproefdierkunde", ELSEVIER Gezondheidszorg, Maarssen, ISBN 978 90 352 2981 5, NUR 883, 2009, pg 66, 70-71

- **Cursussen**

Wouters F., "Veevoeding", cursus, Katho, Departement HIVB, 2009-2010, pgs 56, 76-80, 51-53