

BIOTILGJENGELIGHET AV VITAMIN E I ULIKE TILSKUDDSFØR TIL MELKEKYR.

BIOAVAILABILITY OF VITAMIN E IN DIFFERENT SUPPLEMENTS FOR DAIRY
COWS.

INGVILD STEINNES LUTEBERGET

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
INSTITUTT FOR HUSDYR OG AKVAKULTURVITENSKAP
MASTEROPPGAVE 30 STP. 2012



Forord

Denne masteroppgaven er skrevet ved Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap ved Universitetet for miljø og biovitenskap på Ås, våren 2012. Oppgaven er en del av et prosjekt i regi av Bioforsk, kalt: ”Natural sources of antioxidants – a necessity for animal health and welfare and product quality in organic livestock production”.

Interessen for ernæring og drøvtyggere gjorde valget av retning innen masterstudiet enkelt. Oppgaven ble valgt med utgangspunkt i at jeg ønsket å fordype meg innen drøvtyggerernæring.

Jeg vil takke alle som har bidratt i det praktiske arbeidet med oppgaven. Takk til alle ved Senter for Husdyrforsøk for hjelp med uttak av prøver og informasjon om hvordan daglige rutiner i forsøket ble utført. For hjelp til vitamin E analyser vil jeg takke Søren Krogh Jensen, Elsebeth Lyng Pedersen og Mette Würtz ved Foulum forskningscenter, Århus universitet, Danmark. Jeg vil også takke Siri M. S. Brandstorp, Janne Fossum, Kristine Hov Martinsen og Eirik Kallevik Nesheim for korrekturlesing og oppmuntring.

Takk til mine biveiledere Erling Thuen, for all hjelp med forsøket, og Håvard Steinshamn for utførelse av statistiske beregninger og hjelp med oppgaven. Til slutt vil jeg takke min hovedveileder Odd Magne Harstad for god veiledning og mange gode innspill.

Det har vært svært lærerikt å skrive denne oppgaven, og en naturlig avslutning på 5 års studier på husdyrvitenskap. Studietiden på UMB har vært utrolig bra, lærerik og minneverdig.

”Alt æ relativt, det komme an på kem som ser”

Janove Ottesen, 2005 (I sangen: KGB)

Ås, 15. mai 2012

.....

Ingvild Steinnes Luteberget

Sammendrag

Det har lenge vært kjent at naturlig vitamin E er mer biologisk tilgjengelig enn syntetisk vitamin E. Dette skyldes at den stereokjemiske strukturen er forskjellig i naturlig og syntetisk vitamin E. Stereokjemisk struktur beskriver konformasjonen i kirale senter i molekylet. Vitamin E (α -tokoferol) har tre kirale sentere og dermed 8 mulige stereoisomerer. Naturlig α -tokoferol produseres av stereospesifikke enzymer i planter og har derfor alltid strukturen RRR- α -tokoferol. Syntetisk vitamin E er en blanding av alle 8 mulige stereoisomerer på grunn av at syntesen skjer ved reaksjon mellom to molekyler. Den begrensende faktoren for opptak av vitamin E i blodet er et stereospesifikt transportprotein kalt α -tokoferol transfer protein (α -TTP). Dette proteinet er viktig for transport av α -tokoferol fra lysosomene i leveren til lipoproteinene i blodet og er dermed avgjørende for at α -tokoferol skal gjøres tilgjengelig for ulike vev. α -TTP gjenkjenner den naturlige stereoisomerer i større grad enn de syntetiske, men det er forskjell i hvilken grad de syntetiske stereoisomerene blir gjenkjent. 2R-isomerene ligner mer på RRR- α -tokoferol i kvartærstruktur enn 2S-isomerene, og biotilgjengeligheten av 2R-isomerene er derfor større enn biotilgjengeligheten av 2S-isomerene.

Forskjell i biotilgjengelighet av vitamin E i tilskuddsfôr med tangmel, naturlig vitamin E og syntetisk vitamin E ble undersøkt i fôringsforsøk med 24 kyr av rasen Norsk Rødt Fe (NRF) i midt- og seinlaktasjon. Analyse av forsøksblandingene viste et lavt innhold av vitamin E i forsøksblandingen med tangmel og derfor kunne ikke biotilgjengelighet av vitamin E i tangmel fastsettes ut i fra dette forsøket. Innhold av vitamin E i forsøksblandingene med naturlig- og syntetisk vitamin E ble kraftig redusert ved pelletering, trolig på grunn av en blokkering av pelletpressa som førte til høy temperatur under prosessering. Vi kunne likevel beregne forskjell i biotilgjengelighet mellom naturlig- og syntetisk vitamin E. Forskjellen var større enn det som til nå er generelt akseptert, noe som samsvarer med andre nylig utførte studier på melkekyr.

Tangmel inneholder naturlig vitamin E, men likevel er innholdet for lavt til at tangmel kan brukes som tilskuddsfôr for dyr med stort behov for vitamin E. Med antagelse om at vitamin E i tangmel er like tilgjengelig som andre kilder til naturlig vitamin E må det tilføres ca. 3,5 kg tangmel daglig for å dekke anbefalingene fra National Research Council, USA på 20 mg/kg tørrstoffopptak, dersom tangmel er eneste kilde til vitamin E i rasjonen. Siden tangmel har et lavt

energiinnhold vil en så stor mengde tangmel redusere det totale energiopptaket og dermed også melkeproduksjonen.

Ferskt gras har et høyt innhold av vitamin E og vil kunne dekke behovet for vitamin E til melkekyr. Surfôr er også en viktig kilde til vitamin E, men det kvantitative innholdet er svært variabelt. Dersom surfôret har et betydelig innhold av vitamin E og grovfôropptaket er høyt vil det ikke være nødvendig å gi tilskudd av vitamin E til kyr i midt- og seinlaktasjon. Likevel er det vanskelig å estimere innholdet av vitamin E i surfôr, og analysering er per i dag kostbart og krevende å utføre. Det bør derfor gis tilskudd av vitamin E til melkekyr i innefôringsperioden, særlig i perioden rundt kalving da behovet er størst.

Dersom det er mulig å gi tilskudd av naturlig vitamin E vil dette være positivt for økologisk melkeproduksjon, der det er et mål om å bruke minst mulig syntetiske tilsetningsmidler. Tilskudd av naturlig vitamin E vil også føre til et lavere kvantitativt behov på grunn av større biotilgjengelighet. Ut fra resultatene fra dette forsøket vil det kreves 3 ganger mer syntetisk vitamin E, enn naturlig vitamin E for å dekke samme behov. Dermed kan bruk av naturlig vitamin E bidra til å redusere forbruket av tilskuddsfôr i melkeproduksjonen. Dersom naturlig vitamin E skal brukes som tilskudd i økologisk melkeproduksjon, bør produksjonsmetodene være i tråd med prinsippene innen økologisk produksjon.

Abstract

It is well known that natural vitamin E is more biological available than synthetic vitamin E. This is due to the difference in stereochemical structure between natural- and synthetic vitamin E. Stereochemical structure describes the confirmation of kiral centers in the molecule. α -tocopherol has three kiral centers and thus 8 possible stereoisomers. Natural vitamin E is produced by stereospecific enzymes in plants and therefore always has the RRR- α -tocopherol structure. Synthetic vitamin E is a racemic mixture of all of the 8 possible stereoisomers because the synthesis takes place by reaction between two molecules. The limiting factor for uptake of vitamin E the blood is a stereospecific transport protein called α -tocopherol transfer protein (α -TTP). This protein is important for transfer of α -tocopherol from liver lysosomes to lipoproteins in the blood. Thus α -TTP is crucial for making α -tocopherol available for different tissues. α -TTP recognizes the natural stereoisomer to a greater extent than the synthetical, but there are differences in what extent the different synthetical stereoisomers are recognized. Other 2R-isomers are more similar to RRR- α -tocopherol in quaternary structure than the 2S-isomers, hence is the 2R-isomers more bioavailable then the 2S-isomers.

Difference in bioavailability of vitamin E in additive feed mixtures with seaweed, natural vitamin E and synthetic vitamin E were investigated in a feed trial with 24 Norwegian Red cows in mid- and late lactation. Analysis of the feed mixtures showed a low content of vitamin E in the mixture with seaweed and therefore the bioavailability of vitamin E in the seaweed could not be determined from this trial. The content of vitamin E in the research mixtures was strongly reduced under the pelleting process probably due to a blocking of the pellet press. We could still calculate the difference in relative bioavailability of natural and synthetic vitamin E. The difference was larger than what is generally accepted, which is in accordance with other recently executed experiments.

Seaweed contains natural vitamin E, but the content is too low for seaweed to be suitable as a supplement of vitamin E for dairy cows with high requirements of vitamin E. With the premise that vitamin E in seaweed is just as available as natural vitamin E from other sources, approximately 3,5 kg of seaweed is needed to meet the recommendations given by the National Research Council USA, if seaweed is the only source of vitamin E in the diet. Since the energy

content of seaweed is low, large amounts of seaweed in the diet will decrease the cow's energy consumption and hence the milk production.

Fresh grass has a high content of vitamin E and cows grassing on pasture can meet the requirements of vitamin E for dairy cows. Silage is also an important source of vitamin E, but the content is highly variable. If the silage has a considerable amount of vitamin E and the uptake is high, it will not be necessary to give supplements of vitamin E to dairy cows in mid- and late lactation. However, it is difficult to estimate the content of vitamin E in silage, and analyzing the silage for content of vitamin E is expensive and demanding. Supplements should therefore be given to dairy cows, especially in the indoor season when the requirements are greatest.

One of the goals in ecological milk production is to use as little synthetic supplements as possible. Supplements with natural vitamin E will therefore be positive in an ecological perspective. Adding natural vitamin E to the diet will also decrease the amount of vitamin E needed to meet the requirements because of higher bioavailability. The results from this trial show that 3 times more all-*rac*- α -tocopherol than RRR- α -tocopherol is needed to meet the same requirement. Using natural vitamin E as a supplement can therefore contribute to a reduced consumption of feed supplements. If natural vitamin E should be used as a supplement in ecological milk production, the production methods should be in line with the principles of ecological production.

Innhold

1.0	Innledning	1
2.0	Vitamin E i melkeproduksjon	3
2.1	Vitamin E – Nomenklatur og kjemisk struktur	3
2.1.1	Stereokjemisk struktur	4
2.2	Kilder til vitamin E.....	5
2.2.1	Grovfôr	6
2.2.2	Kraftfôr	8
2.2.3	Tilskuddsfôr.....	9
2.2.4	Tangmel	9
2.3	Fordøyelse, absorpsjon og intermediaær omsetting av vitamin E	11
2.3.1	Stabilitet i vom.....	11
2.3.2	Absorpsjon og transport.....	11
2.3.3	Overføring til vev	14
2.3.4	Lagring og utskillelse av vitamin E.....	14
2.3.5	Sekresjon av vitamin E i melk.....	14
2.4	Vitamin E som antioksidant	15
2.5	Vitamin E og selen	16
2.6	Biotilgjengelighet	16
2.6.1	Metoder for å skille mellom de ulike stereoisomerene av α -tokoferol.....	19
2.7	Behov for vitamin E hos melkekyr	19
2.8	Vitamin E i økologisk produksjon	21
3.0	Egne forsøk	22
3.1	Material og metoder	22
3.1.1	Gjennomføring av forsøket.....	22

3.1.2 Forsøksdyr	22
3.1.3 Forsøksdesign	23
3.1.4 Forsøksfôr	25
3.1.5 Tildeling av fôr	29
3.1.6 Registreringer, prøvetaking og analyser	29
3.1.7 Analysemetoder	34
3.1.8 Beregninger	38
3.1.9 Statistisk modell	41
3.2 Resultater.....	42
3.2.1 Kjemisk sammensetning av fôret	42
3.2.2 Fôrets innhold av α -tokoferol	43
3.2.3 Opptak av fôr	46
3.2.4 Hold og vekt	48
3.2.5 Melkeytelse og innhold av fett og α -tokoferol i plasma og melk.....	48
3.2.6 Biotilgjengelighet	52
3.3 Diskusjon.....	56
3.3.1 Innhold av α -tokoferol i fôret	56
3.3.2 Fôropptak.....	58
3.3.3 α -tokoferol i plasma og melk.....	59
3.3.4 Biotilgjengelighet	60
3.3.5 Tilskudd av vitamin E i økologisk melkeproduksjon.....	62
3.4 Konklusjon	64
4.0 Litteraturliste.....	65

1.0 Innledning

Vitaminer er organiske molekyler som dyr har behov for i små mengder. Vitaminene B og C er klassifisert som vannløselige vitaminer, mens A, D, E og K er klassifisert som fettløselige vitaminer (McDonald 2002). Drøvtyggere klarer ofte å dekke sitt behov for B vitaminer, samt vitamin K ved hjelp av mikroorganismenes syntese i vomma (Sjaastad et al. 2010). Vitamin C kan syntetiseres fra glukose (McDonald 2002), mens vitamin D produseres i kroppen når huden blir utsatt for sollys (Sjaastad et al. 2010). Vitamin A og E må tilføres via fôret.

Vitamin E er en viktig antioksidant som bidrar i cellenes beskyttelse mot skadelig oksidering (Bramley et al. 2000). Mangel på vitamin E kan føre til alvorlige tilstander som kreft, betennelsesykdommer og aterosklerose ("åreforkalkning") forårsaket av lipidoksidering, nedbrytning av protein og skader på DNA (Nockels 1996). I og med at vitamin E er en antioksidant, har lipidstabiliteten i melk sammenheng med innholdet av vitaminet i melka (Vagni et al. 2011). Vitamin E blir også ansett som viktig i humanernæringen, og et høyt innhold av dette vitaminet i melk og melkeprodukter er derfor positivt. Vitamin E er en samlebetegnelse på 8 fettløselige komponenter med ulik vitamin E-aktivitet (McDonald 2002). Med vitamin E-aktivitet menes det hvor mye av vitaminet som "*har en effekt, eller gir en respons i levende vev*" (Blood & Studdert 1999). α -tokoferol er den viktigste vitamin E-komponenten i fôr til melkekyr, og er den komponenten med størst vitamin E-aktivitet (McDonald 2002).

Hvor stor del av vitamin E i fôret som blir gjort tilgjengelig for metabolisme i dyret (biotilgjengelighet), varierer. Biotilgjengelighet er et mål som uttrykker hvor mye av vitamin E som blir tatt opp og blir tilgjengelig for bruk i intermediær omsetning (Bramley et al. 2000). Kunnskap om biotilgjengeligheten til vitamin E er viktig for å kunne fastsette det kvantitative behovet for vitamin E fra ulike kilder. Det har lenge vært kjent at naturlig vitamin E har større biotilgjengelighet enn syntetisk vitamin E (Blatt et al. 2004), men å tallfeste forskjellen er vanskelig ettersom ulike forsøk og forsøksmetoder har gitt ulike resultater (Dersjant-Li & Peisker 2010). Det er derfor uenighet blant forskere om hvor mye mer biotilgjengelig naturlig vitamin E er i forhold til syntetisk vitamin E. Den offisielt aksepterte forskjellen i biotilgjengelighet mellom naturlig- og syntetisk vitamin E på 1,36:1, er basert på forsøk med rotter (Blatt et al. 2004). Nyere forskning viser at dette forholdstallet for biotilgjengelighet ikke

direkte kan overføres til melkeku (Dersjant-Li & Peisker 2010). Forsøk av Meglia et al. (2006) indikerer at forskjellen i biotilgjengelighet mellom naturlig- og syntetisk vitamin E hos melkekyr er større enn 1,36:1.

På grunn av variabelt innhold av vitamin E i grovfôr, kan det i melkeproduksjonen oppstå mangel på vitamin E dersom det ikke blir gitt tilskudd. Den enkleste og billigste måten å tilføre vitamin E til melkekyr på, er ved å gi tilskudd av syntetisk vitamin E (Jensen & Lauridsen 2007). I økologisk melkeproduksjon er det imidlertid et mål å bruke minst mulig av syntetiske tilsetningsstoffer. Det er gitt dispensasjon til å bruke syntetisk vitamin E i økologisk melkeproduksjon i Norge, men det er likevel ønskelig å finne alternative tilskuddsfôr som inneholder den naturlige formen av vitamin E. Med en høyere biotilgjengelighet vil tilskudd av naturlig vitamin E føre til et mindre forbruk av tilskuddsfôr.

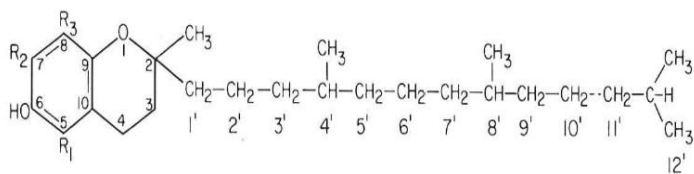
Tangmel regnes for å ha et betydelig innhold av vitamin E (Jensen 1969), og kan derfor være en aktuell kilde for vitamin E til melkekyr. Tangmel er en naturlig ressurs som har blitt brukt til dyrefôr i mange århundrer, men effekten av tangmel er det forsket lite på (Allen et al. 2001). Formålet med denne oppgaven var å bestemme forskjellene i biotilgjengelighet av vitamin E i tangmel, syntetisk vitamin E og naturlig vitamin E (ekstrahert fra planteoljer), for å belyse om tangmel kunne være et egnet tilskudd av vitamin E i økologisk melkeproduksjon. Oppgaven har én teoridel og én eksperimentell del. I teoridelen blir det lagt størst vekt på å belyse forskjellen i biotilgjengelighet mellom naturlig- og syntetisk vitamin E. Materialet som danner grunnlaget for den eksperimentelle delen av oppgaven inngikk som en del av et prosjekt i regi av Bioforsk kalt ”Natural sources of antioxidants – a necessity for animal health and welfare and product quality in organic livestock production”.

2.0 Vitamin E i melkeproduksjon

2.1 Vitamin E – Nomenklatur og kjemisk struktur

Vitamin E kan deles i to grupper. Tokoferolene, som har en mettet sidekjede, og tokotrienolene, som har en umettet sidekjede. De fire tokoferolene er navngitt α -, β -, γ - og δ -tokoferol.

Tokoferolene har høyest biologisk aktivitet og det finnes kvantitativt mer av tokoferolene enn tokotrienolene i planter. α -tokoferol er den komponenten som har størst betydning av vitamin E forbindelsene. β -tokoferol innehar 45 % av aktiviteten til α -tokoferol, mens γ - og δ -tokoferol bare har henholdsvis 13 % og 0,4 % (McDonald 2002). Tokotrienolene har samme benevnning (α -, β -, γ - og δ -tokotrienol), men bare α -tokotrienol har vist betydelig vitamin E-aktivitet (McDonald 2002). Figur 1 viser generell struktur for vitamin E med spesifikasjoner for strukturell forskjell mellom de ulike komponentene.



Tocopherol	R ₁ (5)	R ₂ (7)	R ₃ (8)	Side chain double bonds (3', 7', 11', positions)
alpha	CH ₃	CH ₃	CH ₃	
beta	CH ₃	H	CH ₃	
gamma	H	CH ₃	CH ₃	
delta	H	H	CH ₃	
alpha tocotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₃	+
beta tocotrienol	CH ₃	H	CH ₃	+
gamma tocotrienol	H	CH ₃	CH ₃	+
delta tocotrienol	H	H	CH ₃	+

Figur 1: Generell struktur av vitamin E, med spesifikasjoner for strukturell forskjell mellom de ulike komponentene (Hentet fra: McDowell 1988).

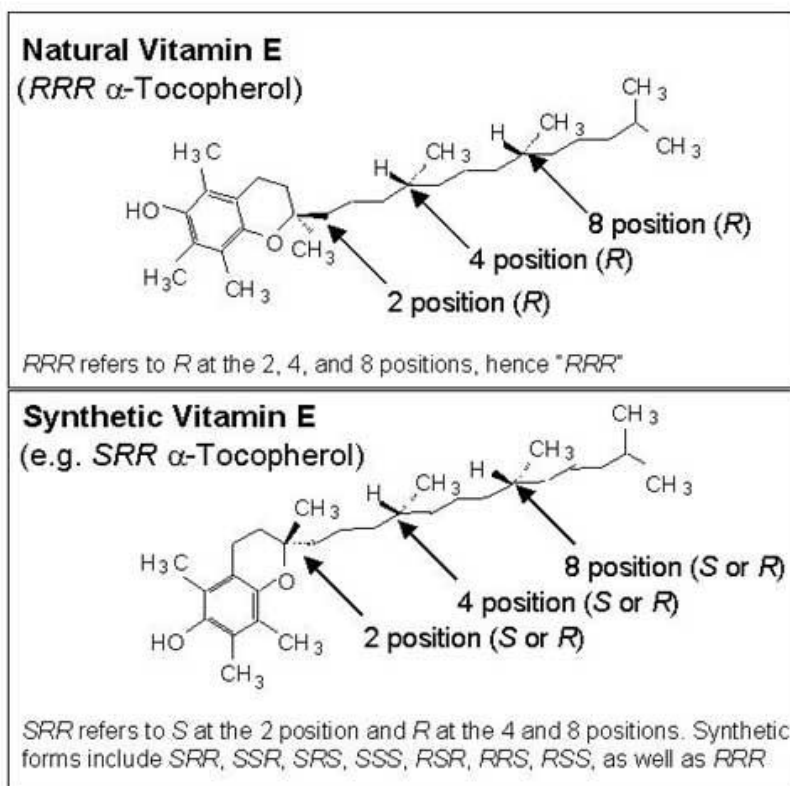
2.1.1 Stereokjemisk struktur

Den stereokjemiske strukturen referer til kvartærstrukturen (romlig struktur) til molekylet. Stereoisomerer har nøyaktig samme kjemiske sammensetning og atomsekvens, men er ulike i hvordan atomene er plassert i rommet (Hart et al. 1995). Molekyler som har ulike stereoisomerer må ha ett eller flere kirale senter. Et kiralt senter er et karbonmolekyl som er bundet til fire forskjellige atomer eller atomgrupper. Dersom to molekyler har samme kjemiske struktur, men to av atomene eller atomgruppene som er bundet til det kirale senteret har motsatt plassering, er disse molekylene stereoisomerer til hverandre (Hart et al. 1995).

Stereoisomerer kan være enantiomerer eller diastereomerer. Enantiomerer er speilbilder av hverandre og har motsatt konfigurasjon i alle kirale senter. Diastereomerer er også stereoisomerer, men er ikke speilbilder av hverandre. De har samme konfigurasjon i noen kirale senter, men ulik konfigurasjon i andre kirale senter (Hart et al. 1995).

Hvert kirale senter har en forstavelse (R-høyre eller S-venstre) som forteller om konfigurasjonen i dette kirale senter er høyre- eller venstrehendt. α - tokoferol har tre kirale sentere (Bramley et al. 2000) og dermed 8 mulige stereoisomerer (RRR-, RSS-, RSR-, RRS-, SRR-, SSR-, SRS- og SSS-). De kirale senterne finnes i posisjon 2, 4 og 8 på fettsyredelen av α - tokoferol (se Figur 2). RRR- α - tokoferol har R-konfigurasjon i posisjon 2,4 og 8. RSS- α - tokoferol har også R-konfigurasjon i 2 posisjon, men har S-konfigurasjon i posisjon 4 og 8. RRR og SSS er eksempel på enantiomerer. RRS og RSS er eksempel på diastereomerer.

Det er vanlig å skille mellom 2R-isomerene (isomerer med R-konfigurasjon i 2. posisjon) og 2S-isomerene (isomerene med S-konfigurasjon i 2. posisjon) av α - tokoferol i forhold til biotilgjengelighet. 2R-isomerene har vist høyere biotilgjengelighet enn 2S-isomerene. Dette skyldes at det har størst betydning hvilken konfigurasjon som er i 2. posisjon fordi 2. posisjon er knyttet til kromanolringen på molekylet og fører til at 2S-konfigurasjon gir motsatt plassering av kromanolringen i rommet sammenlignet med 2R-konfigurasjon (se Figur 2).



Figur 2: Stereokjemisk struktur (Traber & Leonard 2001)

2.2 Kilder til vitamin E

Naturlig α -tokoferol kan kun produseres av planter. Syntesen i planter foregår med stereospesifikke enzymer som fører til at naturlig α -tokoferol alltid har samme stereokjemiske struktur, nemlig *RRR*- α -tokoferol (Jensen & Lauridsen 2007). Syntetisk vitamin E blir produsert ved en kjemisk reaksjon mellom to molekyler. Konformasjonen til disse molekylene fører til at syntetisk vitamin E blir en blanding av alle 8 mulige stereoisomerer av α -tokoferol og kalles all-rac- α -tokoferol (Jensen & Lauridsen 2007). All-rac- α -tokoferol består av ca. 12,5 % av hver stereoisomer. Innhold av α -tokoferol oppgis ofte i internasjonale enheter. I følge European Food Safety Authority (EFSA 2010) er én internasjonal enhet er definert som 1 mg all-rac- α -tokoferolacetat eller 0,67 mg *RRR*- α -tokoferol.

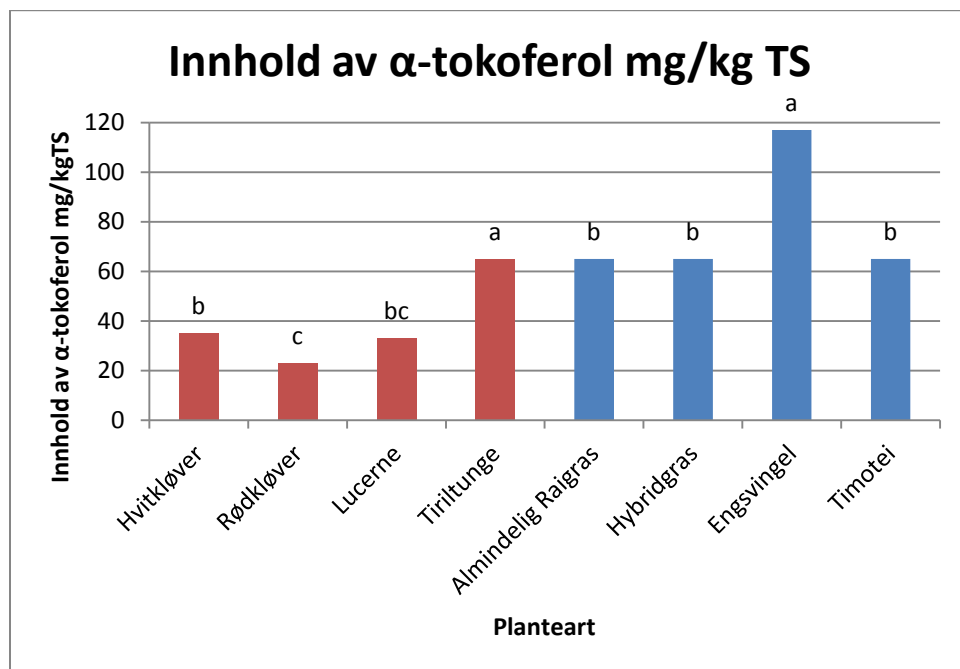
2.2.1 Grovfôr

Grovfôr til melkekyr består i hovedsak av gras og belgvekster. Innhold av vitamin E varierer mye i planter (Weiss 1998). Ferskt gras inneholder store mengder naturlig vitamin E (80 – 200 IE/kg) (Weiss 1998), og kyr på beite vil i stor grad kunne dekke sitt behov for vitamin E gjennom graset.

Det er vanskelig å estimere innholdet av vitamin E i grovfôr, fordi innholdet er avhengig av blant annet høstetidspunkt, konserveringsmetode og botanisk sammensetning.

Botanisk sammensetning

Det er stor variasjon i innhold av α -tokoferol mellom ulike plantearter. Grasartene har ofte et høyere innhold av vitamin E enn belgvekstene (Danielsson H. et al. 2008). I et forsøk av Sjøgaard et al. (2010) ble innhold av α -tokoferol i ulike gras og belgvekster undersøkt (Figur 3). I denne undersøkelsen (Sjøgaard et al. 2010) hadde engsvingel et innhold av α -tokoferol på ca. 118, sammenlignet med ca. 22 mg/kg TS i rødkløver (Figur 3).



Figur 3: Innhold av α -tokoferol i ulike gras- og belgvekster funnet i forsøk av Sjøgaard et al. (2010). Ulike bokstaver viser signifikant forskjell mellom artene innenfor de to gruppene.

Høstetidspunkt

Konsentrasjonen av vitamin E er større i bladene enn i stengelen på planter (Brown 1953). Forholdet mellom blad og stengel endrer seg med utviklingen til planten. Høsting på et tidlig utviklingsstadium, der andelen blad er større enn ved et senere utviklingsstadium, vil derfor øke innholdet av vitamin E i grovfôret. Ulike studier viser likevel forskjellige resultater for hva som er optimalt høstetidspunkt for å maksimere innholdet av vitamin E i grovfôret (Lindqvist 2012).

Konserveringsmetode

Metode for konservering av gras har stor effekt på innholdet av vitamin E i grovfôr. Når kuttet gras blir utsatt for sollys reduseres innholdet av vitamin E (Weiss 1998). Tørking til høy vil derfor kunne redusere innholdet av vitamin E med opptil 90 % (McDonald 2002). For å bevare innholdet av vitamin E i grovfôr, er ensilering en bedre metode enn tørking til høy. Lindqvist et al. (2011a) fant ingen reduksjon i innhold av vitamin E ved ensilering av ubehandla gras. Ensilering i silo ser ut til å bevare innholdet av vitamin E bedre enn ensilering i rundballer (Bernhoft et al. 2002; Nadeau et al. 2004). Årsaken kan være at det ofte skjer en kraftigere pH-senkning i silo, enn i rundballer, men effekten av pH på innhold av vitamin E i grovfôr synes ikke å være eksperimentelt bevist.

Lindqvist et al. (2011a) viste en økning i innhold av vitamin E i grovfôr ved bruk av inokulant og syrebasert tilsetningsmiddel ved ensilering. Det finnes ingen åpenbare forklaringer til denne økningen, men Lindqvist et al. (2011a) foreslår muligheten for at det kan ha vært α - tokoferolproduserende mikroorganismer tilstede på plantene. Noen mikroorganismer har evnen til å produsere α -tokoferol under visse forhold, for eksempel dersom det er etanol tilstede (Tani & Tsumura 1989).

Forsøket av Lindqvist et al. (2011) viser antydninger til at inokulant er et velegnet ensileringsmiddel for å opprettholde vitamin E innholdet i grovfôret, men effekten ser ut til å variere med botanisk sammensetning. Det kreves mer forskning på dette området for å kunne fastsette effekten av konserveringsmidler på innholdet av vitamin E i grovfôr (Lindqvist et al. 2011a).

2.2.2 Kraftfôr

Kraftfôr består i hovedsak av korn og kornprodukter, men er ofte tilsatt fettkilder i form av vegetabiliske oljer for å øke energiinnholdet. Korn inneholder naturlig vitamin E, men tokoferolsammensetningen varierer. Bygg har størst andel av α -tokoferol i likhet med gras, mens mais inneholder en betydelig andel γ -tokoferol (McDonald 2002). Siden vitamin E er et fettløselig molekyl, inneholder ofte fettrike fôrmidler mye vitamin E. Vegetabiliske oljer som solsikkeolje, rapsolje og palmeolje er gode kilder til naturlig vitamin E (Jensen & Lauridsen 2007). Maling og varmebehandling reduserer i stor grad det naturlige innholdet som finnes i korn (Weiss 1998). De fleste kraftfôrblandinger har et lavt innhold av vitamin E på grunn av det høye innholdet av korn. Tabell 1 viser en oversikt over vitamin E-innhold i vanlige kraftfôrkomponenter før prosessering. Det er variasjon mellom kornsortene, der bygg har det høyeste innholdet av vitamin E blant de kornsortene som er nevnt i Tabell 1. Raps- og rybsfrø har et høyt innhold av vitamin E sammenlignet med ekstrahert soya (Fôrtabellen 2008).

Tabell 1: Vitamin E innhold i vanlige kraftfôrkomponenter før prosessering (Fôrtabellen 2008).

Kraftfôrkomponent	Innhold av vitamin E i mg/kg TS
Havre	24,5
Bygg middels kvalitet	27,0
Rug	22,0
Hvete	19,0
Mais	15,0
Raps- og rybsfrø	150,0
Soya – ekstrahert	7,5

2.2.3 Tilskuddsfôr

Ettersom innholdet av vitamin E i grovfôr er variabelt er det vanlig å gi tilskudd av vitamin E. Den vanligste typen kommersiell vitamin E er fullsyntetisk (all-rac- α -tokoferol). Denne typen er billigst å produsere og blir derfor ofte brukt (Jensen & Lauridsen 2007). Naturlig vitamin E kan ekstraheres fra vegetabiliske kilder og brukes som tilskuddsfôr. Det er vanlig å skille mellom rent naturlig vitamin E som består av umodifisert RRR- α -tokoferol, og semisyntetisk vitamin E der produktet esterifiseres for å danne RRR- α -tokoferylacetat eller RRR- α -tokoferylsuccinat (Jensen & Lauridsen 2007). Esterifisering av α -tokoferol blir gjort for å øke stabiliteten av vitaminet (McDowell 1988). EFSA (2010) fant imidlertid ingen forskjell i stabilitet mellom RRR- α -tokoferol, RRR- α -tokoferolacetat og all-rac- α -tokoferolacetat.

2.2.4 Tangmel

Tangmel blir ofte produsert av algen *Ascophyllum nodosum* (grisetang) ved tørking og maling av intakt alge (Allen et al. 2001). Effekten av tangmel i fôr har stort sett vært basert på erfaring (Allen et al. 2001). Innhold av α -tokoferol i grisetang varierer betydelig med årstid. Undersøkelser av Jensen (1969) viser variasjon i innhold av α -tokoferol fra 68 til 116 mg/kg TS (Tabell 2).

Tabell 2: Variasjon i tørrstoff og α -tokoferolinnhold i grisetang (*A. nodosum*) undersøkt av Jensen (1969), som høstet tang ved Flakk, august 1968.

Plante nr.	Tørrstoff %	α -tokoferol mg/kg TS
1	30,9	111,1
2	33,7	91,2
3	31,8	68,3
4	35,3	113,8
5	35,4	116,3
6	32,0	99,2
7	34,6	75,8
8	31,2	78,6
9	33,6	91,9
10	30,6	71,9

Gjennomsnittlig α -tokoferolinnhold = 91,8, standardavvik = 5,6.

2.3 Fordøyelse, absorpsjon og intermediær omsetting av vitamin E

Kunnskapen om omsetting av vitamin E hos drøvtyggere er begrenset (NRC 2001). Transport av vitamin E fra lever til sentral sirkulasjon er den faktoren som har størst påvirkning på biotilgjengeligheten av vitamin E. Derfor vil hovedvekten i dette kapittelet fokusere på mekanismene for opptak og transport av vitamin E i leveren.

2.3.1 Stabilitet i vom

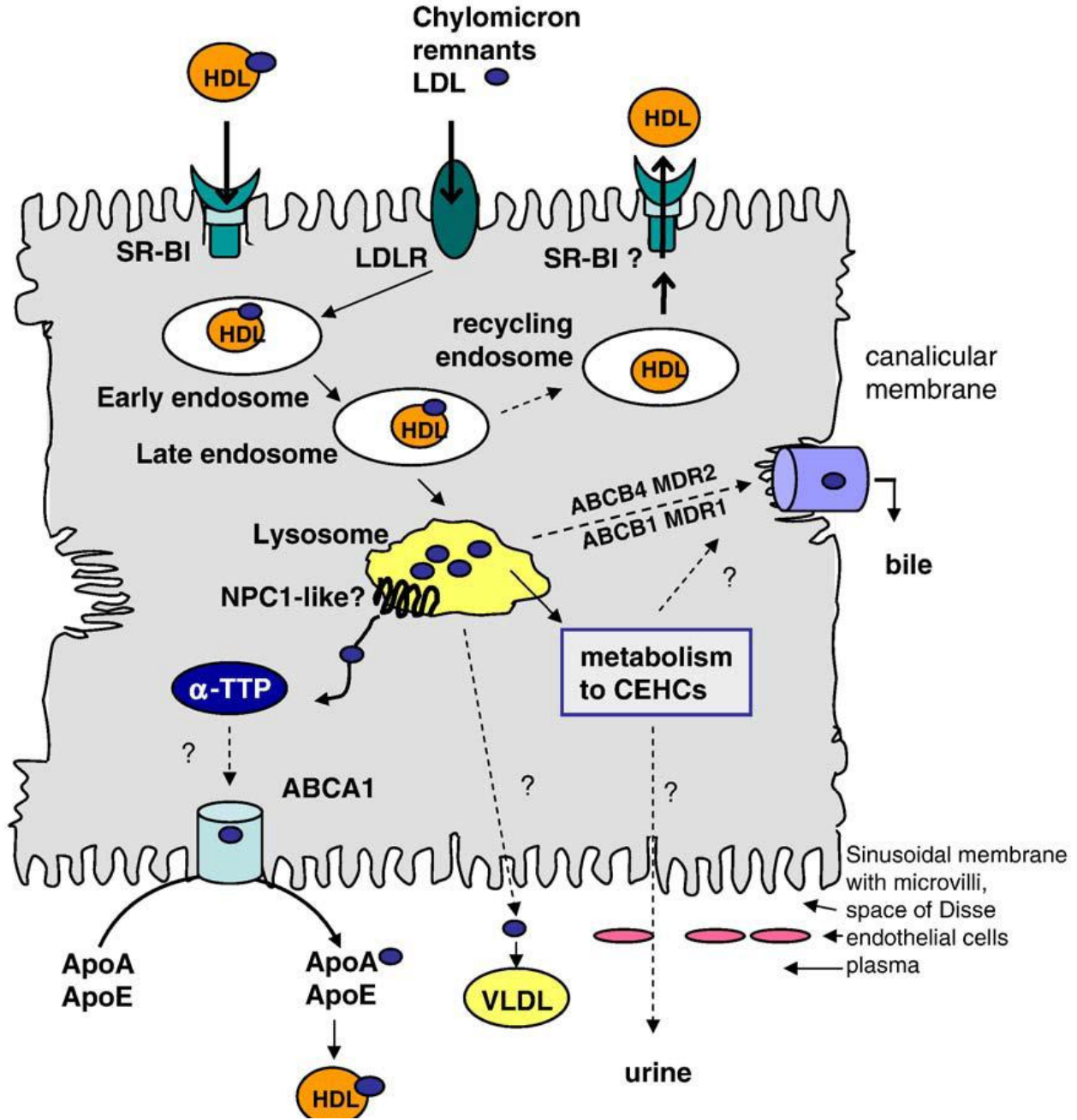
Tidligere studier har antydnet en betydelig nedbrytning av vitamin E i vomma (Alderson et al. 1971). I forsøk utført på okser fôret med 20-80 % mais i rasjonen ble tapet av α -tokoferol i vomma beregnet ved differanse mellom innhold av α -tokoferol i fôr og passasje til bladmagen (Alderson et al. 1971). Med denne teknikken ble tapet av α -tokoferol i vom beregnet til å være opp til 45 %. Nyere studier viser derimot ingen tap av α -tokoferol i vomma, men snarere at all-rac- α -tocoferylacetat var stabil i vomma (Hymøller & Jensen 2010). Årsaken til de store tapene av α -tokoferol som ble funnet i forsøket til Alderson et al. (1971) kan skyldes dårlig ekstrahering av α -tokoferol i bladmageinnholdet (Hymøller & Jensen 2010)

2.3.2 Absorpsjon og transport

Vitamin E blir i stor grad absorbert i tynntarmen. Vitamin E er et fettløselig vitamin og er som andre lipider avhengig av lipolytiske enzymer (lipase) og gallesalter for å kunne fordøyes og absorberes (Sjaastad et al. 2010). Vitamin E overføres til tarmen fra løypen, sammen med andre fettforbindelser, ofte som en samling av fettmolekyler i dråpeform. Vitamin E absorberes i hovedsak som fri alkohol, og vitamin E som er bundet til acetat vil i stor grad blir hydrolysert i tarmveggen (McDowell 1988). Lipase er vannløselig, og hydrolyse av fettløselige vitaminer kan kun skje ved kontaktflaten mellom vann og fett (Sjaastad et al. 2010). For at lipase skal komme i kontakt med vitaminet må overflaten økes ved hjelp av gallesalter. Gallesalter har en fettløselig og en vannløselig del. Den fettløselige delen kan gå inn i fettdråpen, mens den vannløselige forblir på overflaten. Kontraksjoner i tarmen gjør at fettdråpen deler seg opp i mindre fettdråper. På denne måten øker kontaktflaten mellom vann og fett, lipase får større tilgang til vitaminet og kan hydrolysere det (Sjaastad et al. 2010). Hydrolyseproduktene er også hydrofobe og er avhengig av gallesalter for å kunne komme seg gjennom væskefasen som ligger ved overflaten av epitelcellene. Gallesaltene former miceller, som er en samling av celler med både hydrofil og hydrofob karakter. Micellene dannes ved at de hydrofobe endene rettes innover, mens de

hydrofile rettes utover mot væskefasen omkring. Micellene kan omslutte vitaminet og på denne måten blir vitaminet transportert gjennom væskefasen og kommer i kontakt med epitelcellene. Her kan de diffundere over membranen ved passiv diffusjon (Sjaastad et al. 2010).

Inne i tarmcellene (enterocytene) blir vitamin E, sammen med andre lipider, samlet i kylomikroner som blir absorbert inn i lymfesystemet. Videre går kylomikronene over i blodbanen via lymfeårer og transporteres til leveren (Roginski et al. 2003). Før vitamin E tas opp i leverceller blir kylomikronene spaltet av lipoproteinlipase. Delene av kylomikronene som er bundet til vitamin E tas opp i leveren via ”*low density lipoprotein*” (LDL)-reseptor, eller ”*high density lipoprotein*” (HDL)-scavanger reseptor (Brigelius-Flohé 2009). Begge reseptorene overfører ved endocytose og transporterer vitamin E til lysosomene. I lysosomene blir α - tokoferol spaltet av og reseptorene og restene av kylomikronene degraderes eller resirkuleres (Brigelius-Flohé 2009). Noe vitamin E lagres i lysosomene, men lagring skjer i liten grad sammenlignet med andre fettløselige vitaminer. Overføring av vitamin E fra lever til lipoproteiner for transport blir fasilisert av α -tokoferol transportprotein (α -TTP). α -TTP kan skille mellom de ulike stereoisomerene og vil i større grad binde seg til RRR- α -tokoferol, enn de andre stereoisomerene (Jensen & Lauridsen 2007). α -TTP tar opp α -tokoferol fra levercellene og bidrar i transporten til cellemembranen i levercellene. Transportmekanismen er fremdeles ukjent. Ved cellemembranen blir α -tokoferol transportert over membranen ved hjelp av ATP-bindende kassett 1 (ABCA1), som frigjør α -tokoferol inn i et spalteformet rom mellom hepatocytene og endotelcellene som kalles ”Disse rom” (Brigelius-Flohé 2009). Her kan lipoproteiner binde seg til α -tokoferol og transportere det videre i blodet til ulike vev. Noen studier viser at tokoferoler i hovedsak blir transportert i blodet med ”*very low density lipoproteiner*” (VLDL), men Rigotti (2007) konkluderer med at størsteparten blir transportert med LDL og HDL, og kun 20 % med VLDL. Figur 4 illustrer det som er kjent om absorpsjon og transport av vitamin E i leverceller.



Figur 4: Opptak og transport av vitamin E i leverceller (Hentet fra: Brigelius-Flohé 2009). Det er mange aspekter ved opptak og transport av vitamin E i leverceller som fremdeles er ukjent. Disse er merket med stipla linjer og spørsmålsteget. α -tokoferol bundet i delvis oppløste kylomikroner blir tatt opp i leveren av LDL reseptor eller HDL scavenger reseptor. Inne i levercellene blir reseptorene som inneholder α -tokoferol transportert til lysosomene. Her blir α -tokoferol spaltet av og resten av reseptorene og kylomikronene blir brutt ned eller resirkulert. α -TTP tar opp α -tokoferol fra lysosomene. Selve transporten fra lysosomene til cellemembranen er ukjent, men ved cellemembranen blir α -tokoferol overført til lipoproteiner via ATP-bindende kassett 1 (ABCA1) som transporterer α -tokoferol over cellemembranen til "Disse rom". Her kan lipoproteiner binde seg til α -tokoferol og transportere det til ulike vev (Brigelius-Flohé 2009).

2.3.3 Overføring til vev

Vitamin E kan overføres direkte fra lipoproteiner til noen vev, som for eksempel i røde blodlegemer (Roginski et al. 2003), men vil i de fleste tilfeller overføres via reseptoravhengige mekanismer (Rigotti 2007). I vev som kan danne lipoprotein lipase vil opptak av α -tokoferol i stor grad skje ved lipoproteinlipase mekanismen (Roginski et al. 2003). I denne mekanismen vil lipoproteinlipase hydrolysere lipoproteinet, og det skjer en ikke spesifikk overføring av hydrolyseproduktene (Roginski et al. 2003). Dette gjelder særlig i hjertet, muskel- og fettvev. Flere overføringsmekanismer er kjent, uten at disse skal diskuteres nærmere her.

2.3.4 Lagring og utskillelse av vitamin E

Fettvev og binyrer har størst konsentrasjon av vitamin E i kroppen. Fettvev har også størst lager av vitamin E etterfulgt av lever og skjelettmuskulatur, selv om lagrene av vitamin E er begrensede (Roginski et al. 2003). Dersom mengden α -tokoferol i lysosomene er større enn kapasiteten til α -TTP blir noe av overskuddet transportert til galleblæra (Brigelius-Flohé 2009). Stereoisomerer og andre tokoferoler som ikke gjenkjennes av α -TTP kan brytes ned i leveren og skilles ut med urinen (Brigelius-Flohé 2009).

2.3.5 Sekresjon av vitamin E i melk

Flere studier har vist at ved å øke inntaket av vitamin E er det mulig å øke konsentrasjonen av vitamin E i melk (Jensen et al. 1999). Mekanismene for overføring av vitamin E til melk er ikke kjent (Jensen et al. 2005), men Yeargan et al. (1979) foreslår en maksimumsgrense for vitamin E-opptak i melk på opptil 45 μ g/mg melkefett. Stereoisomerfordelingen i melk samsvarer i stor grad med stereoisomerfordelingen i plasma. Meglia et al. (2006) foreslår at det ikke finnes noen mekanismer som skiller mellom de ulike stereoisomerene ved overføring fra plasma til melkeproduserende celler.

2.4 Vitamin E som antioksidant

Vitamin E fungerer som en cellulær antioksidant og er den kvantitativt viktigste antioksidanten i plasma (Roginski et al. 2003). Antioksidanter er en viktig del av kroppens immunforsvar og beskytter cellene mot oksidering av frie radikaler.

Frie radikaler er atomer eller molekyler med ett eller flere uparede elektron (McDonald 2002). Disse er svært ustabile fordi de ikke har fylt opp sine ytterste elektronskall og vil reagere med andre molekyler for å oppnå stabil struktur. De viktigste frie radikalene som dannes i aerobe organismer er reduserte derivater av oksygen (Roginski et al. 2003). Blant disse er superoksid-anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroksyl-peroksid ($\cdot OH$), peroksy (ROO^{\cdot}) og alkoksy (RO^{\cdot}).

Frie radikaler kan angripe celler og forårsake skader. De vanligste skadene forårsaket av frie radikaler er lipidoksidering og nedbrytning av DNA og protein (McDonald 2002). Dersom dette skjer i betydelig omfang kan det bidra til aldring, sykdommer som kreft, aterosklerose og betennelsesykdommer (Nockels 1996). Hos melkeku er mastitt en produksjonssykdom som forårsaker store tap i melkeproduksjonen. Mangel på vitamin E har vist å øke faren for utvikling av mastitt (Hogan et al. 1993).

Frie radikaler blir produsert naturlig i kroppen ved normal metabolisme (Nockels 1996). Under normale omstendigheter produseres radikalene i så liten grad at de ikke vil gi alvorlige konsekvenser som nevnt ovenfor. Skadelig oksidering skjer når produksjonen av frie radikaler blir større enn antioksidantforsvaret kan håndtere. Dette kan komme av fysisk og psykisk stress som aerob aktivitet, skader i cellevev, infeksjoner m.m. (Nockels 1996).

Frie radikaler kan angripe alle biologiske molekyler, men lipider er særlig utsatt. Umettede fettsyrer er mer ustabile enn mettede fettsyrer og er derfor mer utsatt for angrep fra frie radikaler. Cellemembraner består i stor grad av fosfolipider og er derfor særlig utsatt for oksidering. Lipidoksidering er en kjedereaksjon fordi produktet av oksideringsprosessen lager et nytt fritt radikal som kan angripe et annet molekyl (McDonald 2002).

Vitamin E fungerer ved å donere et hydrogen til det frie radikalet og blir dermed selv oksidert (Bramley et al. 2000). Det frie radikalet stabiliseres, kjedereaksjonen termineres og det dannes et α -tokoferolradikal. α -tokoferolradikalet har evne til hurtig regenerering til α -tokoferol, og dette er årsaken til at vitamin E fungerer bra som antioksidant (Roginski et al. 2003).

2.5 Vitamin E og selen

Selen er et mineral som inngår i glutation peroksidase komplekset, som blant annet fungerer som antioksidant (McDowell 2003). Vitamin E og selen blir ofte omtalt sammen da de i stor grad har overlappende effekter og mangelsymptomer (ARC 1980). Tilførsel av selen påvirker behovet for vitamin E ettersom selen også bidrar i beskyttelsen mot frie radikaler og vil på den måte redusere faren for lipidoksidering. En del mangelsymptomer for vitamin E oppstår selv om det er tilstrekkelig tilførsel av selen, og selen kan derfor ikke erstatte vitamin E. Årsaken til dette kan være at vitamin E finnes i cellemembranen, mens selen inngår i glutation peroksidase komplekset som er aktivt i cytosol (Herdt & Stowe 1991).

2.6 Biotilgjengelighet

Bramley et al (2000) definerer biotilgjengelighet av vitamin E slik: ”*andelen av inntatt vitamin E som blir tatt opp og anvendt i kroppen*”. Dette betyr at graden av absorpsjon, transport og metabolisme utgjør biotilgjengeligheten (Bramley et al. 2000). Generelt bestemmes biotilgjengeligheten av et stoff ved å måle konsentrasjonen av stoffet i plasma etter oral tilførsel, og sammenligne denne med plasmakonsentrasjon etter intravenøs tilførsel (intravenøs tilførsel gir biotilgjengelighet på 100 %) (Bramley et al. 2000). For vitamin E er det ikke mulig å måle biotilgjengelighet på denne måten siden vitamin E er et fettløselig molekyl, og ikke kan tilføres intravenøst. Derfor brukes relativ biotilgjengelighet som mål på biotilgjengelighet av vitamin E og måles som økning i konsentrasjonen av vitamin E i plasma eller vev etter oral tilførsel (Dersjant-Li & Peisker 2010). Metoden for å finne biotilgjengelighet av de ulike stereoisomerene av α -tokoferol består dermed i å analysere innholdet av de ulike stereoisomerene i blod eller vev og beregne forholdet mellom dem (se kapittel 3.1.9).

Biotilgjengelighet sier altså noe om hvor mye av tilført vitamin E som er tilgjengelig i sentral sirkulasjon. Likevel forteller ikke biotilgjengeligheten hvor mye av vitamin E som egentlig er biologisk aktivt. Biotilgjengelighet er en betingelse for biologisk aktivitet, da vitamin E må være tilstede i sentral sirkulasjon for å kunne virke i ulike vev (Dersjant-Li & Peisker 2010).

Bestemmelse av bioaktivitet innebærer målinger av mangelsymptomer. For vitamin E gjelder dette muskeldystrofi, anemi og andre alvorlige tilstander. Utførelse av slike forsøk har etiske problemstillinger og er særdeles ressurskrevende. Derfor blir biotilgjengelighet brukt for å

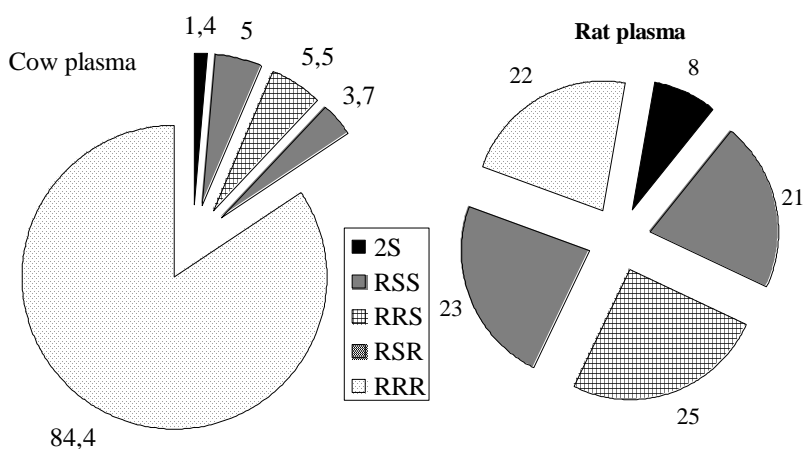
beskrive aktiviteten til vitaminet, på tross av begrensningene det medfører (Jensen & Lauridsen 2007).

Biotilgjengeligheten av vitamin E har vært diskutert i flere tiår, og det har lenge vært generelt akseptert at RRR- α -tokoferol har en høyere biotilgjengelighet enn all-rac- α -tokoferol (Blatt et al. 2004). Det er vanskelig å fastsette hvor stor denne forskjellen i biotilgjengelighet egentlig er. All-rac- α -tokoferol består som nevnt av alle de 8 ulike stereoisomerene av α -tokoferol der alle har ulik biotilgjengelighet. Forskjellen i biotilgjengelighet avhenger derfor ikke kun av forholdet mellom RRR- α -tokoferol og all-rac- α -tokoferol, men også av andelen av de ulike isomerene i rasjonen (Blatt et al. 2004).

Så tidlig som i 1949 utførte Harris og Ludwig forsøk for å bestemme forskjellen i bioaktivitet mellom naturlig- og syntetisk α -tokoferol ved bruk av rotter. De tilskrev RRR- α -tokoferol en høyere bioaktivitet enn 2-ambo- α -tokoferylacetat, som er en blanding av 50 % RRR- α -tokoferol og 50 % SRR- α -tokoferol, med et forhold på 1,36:1 (Harris & Ludwig 1949). Dette forholdet ble også vist av Weiser & Vecchi (1981) og har videre blitt brukt som generelt akseptert forholdstall for forskjell i bioaktivitet mellom naturlig- og syntetisk vitamin E (Dersjant-Li & Peisker 2010). 2-ambo- α -tokoferylacetat har som nevnt 50 % RRR- α -tokoferol, mens all-rac- α -tokoferol kun har 12,5 % RRR- α -tokoferol. Derfor kan ikke forholdstallene beregnet mellom RRR- α -tokoferol og 2-ambo- α -tokoferylacetat likestilles med forholdet mellom RRR- α -tokoferol og all-rac- α -tokoferol (Dersjant-Li & Peisker 2010). Metodologien for forsøkene, samt at forsøkene var utført på rotter gjør også at resultatene ikke direkte kan overføres til å gjelde for melkekyr (Dersjant-Li & Peisker 2010). Selv om det ikke måles bioaktivitet på melkekyr har det generelle forholdstallet for bioaktivitet blitt brukt til sammenligning med resultatene for biotilgjengelighet. Dette skyldes at denne forskningen (Harris & Ludwig 1949) danner grunnlaget for det som er kjent om forskjell i biologisk tilgjengelighet og aktivitet mellom naturlig- og syntetisk vitamin E.

Årsaken til at RRR- α -tokoferol har høyere biotilgjengelighet enn de andre stereoisomerene kan i stor grad forklares av at α -tokoferol-bindende protein (α -TTP) har mulighet til å diskriminere mellom de ulike stereoisomerene (Jensen & Lauridsen 2007). α -TTP vil i større grad binde seg til RRR- α -tokoferol framfor de andre stereoisomerene (Jensen & Lauridsen 2007). α -TTP vil også ha større evne til å binde seg til de andre 2R-isomerene (RSS, RRS, RSR) enn 2S-isomerene da 2R-isomerene er mer lik RRR- α -tokoferol i romlig struktur.

Andelen av de ulike stereoisomerene i plasma varierer med art. Rotter og fjørfe har en større andel av de syntetiske stereoisomerene i plasma enn kyr og griser (Jensen & Lauridsen 2003). Jensen & Lauridsen (2003) konkluderer med at det er forskjell mellom arters evne til å biodiskriminere mellom de ulike stereoisomerene av α -tokoferol. Figur 5 illustrerer forskjellen i fordelingen av stereoisomerer i plasma til ku og rotter fra et forsøk utført av Jensen et al. (2005). Årsaken til forskjellen mellom arter er ikke kjent, men det kan spekuleres i om det har sammenheng med fettinnholdet i blodet. Rotter og fjørfe har et høyere innhold av fett i blodet enn kyr (Pers. med.: Jensen S.K., 17.01.12), og det er mulig at α -tokoferol da kan transporteres uten hjelp av α -TTP. Dette er imidlertid ikke eksperimentelt begrunnet.



Figur 5: Relativ fordeling av α -tokoferol stereoisomerer i plasma hos ku som har fått tildelt 3000 mg all-rac- α -tokoferol per dag og rotter som har fått tildelt 1 mg all-rac- α -tokoferol per dag i 10 dager (Jensen et al. 2005).

2.6.1 Metoder for å skille mellom de ulike stereoisomerene av α -tokoferol

For å kunne si noe om forskjellen i biotilgjengelighet mellom de ulike stereoisomerene av α -tokoferol er det nødvendig å kunne analysere for innholdet av de individuelle stereoisomerene. Det finnes i dag ingen metode som kan skille mellom alle de ulike stereoisomerene på en gang (Jensen & Lauridsen 2007), men ved å kombinere to metoder er det mulig å finne andelen av alle de 8 stereoisomerene. ”*High-performance liquid chromatography*”, forkortet HPLC er et analyseverktøy som brukes for å identifisere innhold eller andel av ulike stoffer i en blanding. Metoden, som er beskrevet av Jensen et al. (1999), gir et kromatografi med 5 toppar. Den ene toppen består av alle 2S-isomerene, og de fire andre toppene viser de fire 2R-isomerene. Ved å beregne arealet under disse toppene sammenlignet med en standard kan man kvantifisere innholdet av de ulike stereoisomerene av α -tokoferol. For å finne de ulike 2S-isomerene må man kombinere denne metoden med GC-metoden (”*gas chromatography*”). Den kan skille mellom fire par av enantiomerer (RSS/SRR, RSR/SRS, RRR/SSS og RRS/SSR) (Jensen & Lauridsen 2007). Hos melkekyr utgjør 2S-isomerene en så liten andel at det ikke er hensiktsmessig å bruke begge metodene for å studere forskjellen i biotilgjengelighet. Derfor er det HPLC-metoden som er mest brukt til analyse av stereoisomerene av α -tokoferol hos melkekyr.

2.7 Behov for vitamin E hos melkekyr

Behov for et næringsstoff er definert som den mengden av næringsstoffet som kreves for å opprettholde god helse og reproduksjon, vekst eller en bestemt melkeytelse (Weiss 1998). Anbefalt tilførsel er høyere enn behovet fordi det er vanskelig å nøyaktig fastsette de nevnte faktorene for alle dyr i besetningen til enhver tid. Anbefalingene vil være tillagt en sikkerhetsmargin for å ta hensyn til variasjon i inntak, produksjon og tilgjengelighet av næringsstoffet (Weiss 1998).

Etttersom det er vanskelig å fastsette et spesifikt behov, gir National Research Council (NRC) anbefalinger for tilførsel for vitamin E til melkekyr (NRC 2001). For å fastsette nøyaktig behov må det utføres titreringsstudier der mindre og mindre vitamin E tilføres til mangelsymptomer oppstår, og mer og mer vitamin E tilføres til forgiftningssymptomer oppstår. Slike studier har etiske problemstillinger og er vanskelige å utføre. Før siste utgave av ”*Nutrient requirements of dairy cattle*” ble publisert (NRC 2001) var anbefalingene for tilskudd av vitamin E 15,0 IE/kg

TS opptak (NRC 1988). Disse anbefalingene var for total tilførsel gjennom rasjonen og varierte i følge NRC (1988) ikke med laktasjonsstadium. De nyeste anbefalingene for daglig tilførsel av vitamin E er på 0,8 IE/kg kroppsvekt (NRC 2001). Dette tilsvarer omtrent 20,0 mg/kg TS opptak. Disse anbefalingene tar hensyn til at behovet for vitamin E varierer med laktasjonsstadium (NRC 2001). Anbefalingene fra NRC er oppsummert i Tabell 3.

Tabell 3: Anbefalt tilførsel av vitamin E til melkekyr (NRC 2001).

Laktasjonsstadium	60 dager før kalving til kalving	Lakterende kyr
IE/kg kroppsvekt	1,6	0,8
IE/kg TS opptak	80,0	20,0

Behovet for vitamin E er størst rundt kalving, da dyret utsettes for stort stress på immunforsvaret (Sjöberg 2005). Rundt kalving går også fôropptaket ned og behovet for tilskudd av vitamin E er derfor større. Kalven blir født uten lager av vitamin E i leveren og er derfor avhengig av å få tilført vitaminet gjennom råmelka (Sjöberg 2005). Innholdet av vitamin E i råmelk er avhengig av tilførselen av vitamin E til kua. Økt tilførsel av vitamin E i sinperioden øker innholdet av vitamin E i råmelka i påfølgende laktasjon (NRC 2001).

Flere faktorer påvirker behovet for vitamin E. Det naturlige innholdet av vitamin E i grovfôret har stor betydning for hvor mye tilskudd som kreves. Uten å analysere for innholdet av vitamin E i grovfôret er det vanskelig å si noe om hvor mye vitamin E grovfôret inneholder. Å analysere for innhold av α -tokoferol er kostbart og arbeidskrevende, samtidig som innholdet av vitamin E varierer med lagringstid og konserveringsmetode. Derfor vil det ikke være praktisk å implementere vitamin E-analyse som en del av vanlig analyse av grovfôr. Som følge av dette er det vanskelig å regne med det naturlige innholdet av vitamin E som finnes i konservert gras ved optimering av rasjonen med tanke på innhold av vitamin E. For beitende dyr vil det likevel være aktuelt å regne med det naturlige innholdet som finnes i graset, da ferskt gras har et høyt innhold av vitamin E. For beitende melkekyr vil tilskudd være mest aktuelt like før og like etter kalving da behovet er størst.

2.8 Vitamin E i økologisk produksjon

Økologisk melkeproduksjon i Norge er en driftsform der det er fastsatt en rekke detaljerte minstekrav (Mattilsynet 2005a). Formålet med driftsformen er å bruke fornybare ressurser på en måte som fremmer et bærekraftig landbruk. I forskriftene er det spesifikasjoner for bruk av konvensjonelt fôr og tilskuddsfôr i økologisk melkeproduksjon (Mattilsynet 2005b). I forordningen står det at bruk av syntetiske vitaminer av typen A, D og E som er identiske med naturlige vitaminer, kan benyttes til drøvtyggere når statens kompetente myndighet på forhånd har gitt tillatelse til det (Mattilsynet 2005b). Mattilsynet har gitt en generell uttalelse som bekrefter at de produktene som finnes i fôrproduksjonen i dag tilfredsstiller disse kravene og kan derfor brukes i økologisk produksjon. Likevel er det i følge de overordnede målene i økologisk melkeproduksjon et mål om å redusere bruk av syntetiske tilsetningsstoffer. Bruk av naturlig vitamin E vil derfor være positivt i et økologisk perspektiv.

3.0 Egne forsøk

3.1 Material og metoder

Denne masteroppgaven er en del av prosjektet NatVit: ”Natural sources of antioxidants – a necessity for animal health and welfare and product quality in organic livestock production”. Formålet med prosjektet var å teste effekten av tilskuddsfôring med tangmel, naturlig vitamin E og syntetisk vitamin E på innhold av vitamin E i plasma, melk og på lipidstabilitet i rømme. Forsøket er også utvidet til å teste effekten av tilskuddsfôrene på antistoffproduksjon etter immunisering. Denne oppgaven er begrenset til å studere biotilgjengelighet av vitamin E hos melkeku og de andre delene av prosjektet vil derfor ikke nevnes videre. Jeg har deltatt i innsamling av prøver knyttet til oppgaven og har analysert prøvene for innhold av fett, α -tokoferol og distribusjon av stereoisomerene av α -tokoferol i plasma, melk og fôr ved Foulum forskningscenter, Århus Universitet, Danmark.

3.1.1 Gjennomføring av forsøket

Forsøket ble utført ved Senter for Husdyrforsøk (SHF) ved UMB, Ås, i løsdriftsfjøset. Forsøket startet mandag 22. august 2011 og ble avsluttet fredag 9. desember 2011. Forsøket ble delt inn i 4 perioder med 4 forsøksledd (latinsk kvadrat), der alle dyr skiftet forsøksledd for hver periode. Hver periode var på 4 uker, der de 3 første ukene var tilvenningsperiode.

3.1.2 Forsøksdyr

Det ble brukt 24 kyr av rasen NRF i forsøket. Alle kyrne var i midtlaktasjon, ca. 150 dager etter kalving, ved forsøksstart. Tabell 4 viser en oversikt over dyrematerialet med laktasjonsnummer og dager ut i laktasjonen ved forsøksstart. Forsøksdyrene ble valgt ut i august 2011 og skulle være mest mulig like i alder, laktasjonsstadium, produksjon og genetisk potensial for melkeytelse. De fleste kyrne var i sin første laktasjon, men 8 av kyrne var i laktasjonsnummer 2-5. Dager ut i laktasjon varierte fra 122 til 231.

Tabell 4: Dyrematerialet brukt i forsøket.

Ku nr.	Laktasjonsnummer	Dager ut i laktasjonen ved forsøksstart
4782	5	199
4821	4	133
4935	4	130
5052	3	231
5201	3	195
5296	2	194
5345	2	122
5409	2	164
5502	1	133
5504	1	166
5516	1	137
5519	1	125
5523	1	181
5524	1	193
5526	1	125
5530	1	150
5532	1	194
5533	1	187
5535	1	187
5544	1	194
5548	1	156
5550	1	155
5562	1	154
5567	1	142

3.1.3 Forsøksdesign

Forsøket ble utført som et 4 x 4 latinsk kvadrat med 6 gjentakelser. Dette gav 4 forsøksledd og 6 kvadrat. Dyrene ble fordelt som vist i Tabell 5.

Tabell 5: Fordeling av dyr på kvadrat, diett og periode. Tangmel er forsøksblanding med 30,5 % tangmel, syntetisk er forsøksblanding med syntetisk vitamin E, naturlig er forsøksblanding med naturlig vitamin E.

Periode	1	2	3	4	
Kvadrat	Ku nr.	-----Forsøksblanding-----			
1	5526	Tangmel	Syntetisk	Naturlig	Kontroll
	5516	Syntetisk	Naturlig	Kontroll	Tangmel
	5502	Naturlig	Kontroll	Tangmel	Syntetisk
	5519	Kontroll	Tangmel	Syntetisk	Naturlig
2	5567	Tangmel	Syntetisk	Naturlig	Kontroll
	5562	Syntetisk	Naturlig	Kontroll	Tangmel
	5530	Naturlig	Kontroll	Tangmel	Syntetisk
	5550	Kontroll	Tangmel	Syntetisk	Naturlig
3	5533	Tangmel	Syntetisk	Naturlig	Kontroll
	5548	Syntetisk	Naturlig	Kontroll	Tangmel
	5504	Naturlig	Kontroll	Tangmel	Syntetisk
	5523	Kontroll	Tangmel	Syntetisk	Naturlig
4	5532	Tangmel	Syntetisk	Naturlig	Kontroll
	5524	Syntetisk	Naturlig	Kontroll	Tangmel
	5544	Naturlig	Kontroll	Tangmel	Syntetisk
	5535	Kontroll	Tangmel	Syntetisk	Naturlig
5	5201	Tangmel	Syntetisk	Naturlig	Kontroll
	5345	Syntetisk	Naturlig	Kontroll	Tangmel
	5296	Naturlig	Kontroll	Tangmel	Syntetisk
	5409	Kontroll	Tangmel	Syntetisk	Naturlig
6	4782	Tangmel	Syntetisk	Naturlig	Kontroll
	4821	Syntetisk	Naturlig	Kontroll	Tangmel
	4935	Naturlig	Kontroll	Tangmel	Syntetisk
	5025	Kontroll	Tangmel	Syntetisk	Naturlig

3.1.4 Forsøksfôr

Fôrmidlene brukt i forsøket ble produsert etter gjeldende regelverk for økologisk produksjon (Mattilsynet 2005b). Forsøksdyrene fikk en lik grunnrasjon bestående av surfôr og kraftfôr, samt 4 ulike forsøksblandinger. Kraftfôret vil heretter bli referert til som grunnfôr for å skille tydelig mellom kraftfôret og forsøksblandingene.

Surfôr

Surfôret var første og andre slått av økologisk dyrka eng med høyt kløverinnhold. Graset ble dyrka på Frydenhaug 3,4,5 og 6. Frydenhaug 3 og 4 ble tilsådd med 2,7 kg/daa Felleskjøpet spire surfôr/beite normal (Timotei ”Grindstad” 65 %, engsvingel ”Fure” 20 %, engrapp ”Knut” 20 %, rødkløver ”Lea” 5 %, hvitkløver ”Sonja” 10 %) og 100g/daa rødkløver ”Bjursele”, med 14 kg/daa bygg ”Iver” som dekkvekst. Frydenhaug 5 og 6 ble plantet med 2,8 kg/daa Felleskjøpet spire surfôr/beite normal (Timotei ”Grindstad” 65 %, engsvingel ”Fure” 20 %, engrapp ”Knut” 20 %, engrapp ”Oxford” 10 %, rødkløver ”Lea” 5 %, hvitkløver ”Sonja/Ramona” 10 %), med 18,5 kg/daa bygg ”Iver” som dekkvekst.

Surfôret ble ensilert i rundballer med 6 lag pakkeplast rundt hver rundball. Første slått ble høstet 15. juni 2011 og presset 16. juni 2011 med 4 liter Ensil 1¹ ensileringsmiddel per rundball. Andre slått ble høstet 13. august 2011 og presset 14. august 2011 med 4 liter Ensil 1 per rundball. Det ble brukt en Kuhn skiveslåmaskin fc 302 til slått, og en Orkel Hiq kombipresse til pressing og pakking av rundballene. Første og andre slått ble blandet i et 1:1 forhold ved fôring for å sikre så jevn tilførsel av vitamin E som mulig. Første og andre slått ble blandet helt fra starten av forsøket (22. august) selv om det bare var 8 dager siden andre slått ble pakket i rundballer.

Grunnfôr

Grunnfôret ble produsert ved Felleskjøpet Agri Lena spesielt til dette forsøket. Dette ble gjort for å sikre at alle ingrediensene var av samme opprinnelse og i like store mengder gjennom hele forsøket. Komposisjon av kraftfôret er vist i Tabell 6.

¹ Ensil 1 ble levert av Felleskjøpet Agri og bestod av 61 % fri maursyre, 20,5 % natriumformiat (totalt 75 % maursyre), 1,5 % laktose. Resterende 17 % var vann og fargestoff (brun).

Tabell 6: Komposisjon av grunnfôret.

Ingredienser	TS Råprotein Råfett FEm ^a AAT ^b PBV ^c						
	g	%	-----g/kg TS-----				
Havre	759						
Rapsfrø	39						
Soyakaker	152						
Rørmelasse	50						
Samlet	1000	88,3	168	68	1,11	106	13

^aFEm: Forenheter melk^bAAT: Aminosyrer absorbert i tarm^cPBV: Proteinbalanse i vom**Forsøksblandinger**

De 4 ulike forsøksblandingene ble produsert ved Fôrtek, UMB.

Forsøksblanding 1: Tangmjøl

Forsøksblanding 2: Naturlig vitamin E (ekstrahert fra planteoljeproduksjon)

Forsøksblanding 3: Syntetisk vitamin E

Forsøksblanding 4: Kontroll (uten tilskudd av vitamin E).

Blandingene ble pelletert med en 5mm matrise i en pelletpresse (Modell RPM 350.100, Münch, Wuppertal, Germany). Ved pelletering av forsøksblanding 1 var temperaturen 76 °C, og det ble tilsatt 40,7 kg damp per time. Ved pelletering av forsøksblandingene 2, 3 og 4 var temperaturen 70 °C og det ble tilsatt henholdsvis 22,6, 25,2 og 24,2 kg damp per time. Temperatur og damp ble redusert ved produksjon av forsøksblandingene 2, 3 og 4 fordi det skjedde en blokkering av pelletpressa under produksjon av forsøksblanding 1. Bygg var hovedingrediens i alle blandingene, men ulike kilder til vitamin E var tilsatt i hver blanding. Komposisjon av forsøksblandingene er vist i Tabell 7. Tabell 8 viser komposisjon av mineralblandingen som skulle brukes i forsøksblanding 2, 3 og 4. Planlagt tilskudd av α -tokoferol fra blanding med naturlig vitamin E og blanding med syntetisk vitamin E er vist i Tabell 9.

Tabell 7: Komposisjon forsøksblandingene.

	---- Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E ----			
	Tangmel	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E	Kontroll
Bygg, %	51.5	74.4	74.0	74.9
Tangmjøl, %	30.5	0.0	0.0	0.0
Melasse, %	3.56	4.17	4.15	4.20
Mineralblanding ¹ , %	0.0	20.7	20.6	20.9
Grovkalk, %	4.07	0.0	0.0	0.0
Monokalsiumfosfat, %	1.59	0.0	0.0	0.0
Magnesiumfosfat, %	5.94	0.0	0.0	0.0
Natriumklorid, %	2.32	0.0	0.0	0.0
Natriumselenitt, g/kg	0.13	0.0	0.0	0.0
Sinksulfat, g/kg	2.20	0.0	0.0	0.0
Mangansulfat, g/kg	1.81	0.0	0.0	0.0
Koboltkarbonat, g/kg	0.04	0.0	0.0	0.0
Kobbersulfat, g/kg	0.70	0.0	0.0	0.0
E-vitamin ² , g/kg	0.0	7.59	12.59	0.0

¹Sammensetning av mineralblandingen er vist i Tabell 8

²Regner innholdet av α -tokoferylacetat til å være 500 000 mg/kg i det syntetiske og 300 000 mg/kg i det naturlige produktet

Tabell 8: Sammensetning av mineralblandingen

Ingredienser	%
Hveteformel	1,835
Kalk grov	24,95
Monokalsiumfosfat	7,45
Magnesiumfosfat MGP	36,32
Fôrsalt	25,52
Mangansulfat	1,03
Sinksulfat	1,26
Koppersulfat	0,4
Koboltkarbonat	0,022
Kalsiumjodat	0,026
Selen	0,073
A vitamin 500000	0,088
D3-500000	0,026
Olje	1,0

Tabell 9: Planlagt tilskudd av α -tokoferol fra blanding med syntetisk og blanding med naturlig vitamin E.

	Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E	
	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E
Tilskudd av vitamin E mg/kg i forsøksfôret	12589	7591
Konsentrasjon av α -tokoferylacetat mg/kg i vitamin E produktet	300 000	500 000
Konsentrasjon av α -tokoferylacetat mg/kg i forsøksfôret	3796	3796
Konsentrasjon av α -tokoferol mg/kg i forsøksfôret	3454	3454
Konsentrasjon av α -tokoferylacetat mg/kg TS ¹ i forsøksfôret	3872	3872
Daglig tilskudd av α -tokoferol i mg fra forsøksfôret	2280	2280

¹TS = tørrstoff.

3.1.5 Tildeling av fôr

Alle forsøksdyr fikk tildelt grovfôr *ad libitum* i separate fôrkar. Det ble tildelt 3,5 kg grunnfôr i kraftfôrautomat per døgn. Det ble gitt 0,7 kg/TS av forsøksblanding 1, og 0,6 kg/TS av forsøksblanding 2, 3 og 4 per døgn. Forsøksblandingene ble tildelt ved morgenmelking kl 06:00. I starten av forsøket ble forsøksblandingene tildelt for seg, men det oppstod problemer med at kyrne ikke spiste forsøksblandingene. Derfor ble forsøksblandingene tildelt sammen med 1 kg grunnfôr ved melking. Én kilo grunnfôr ble da trukket fra mengden tildelt i kraftfôrautomaten. Senere i forsøket ble tildelingen av forsøksblandingene fordelt på morgen- og ettermiddagsmelking (kl 06:00 og 15:00) sammen med 1 kg grunnfôr for hver tildeling. Derfor ble det trukket fra ytterligere én kg grunnfôr fra tildelingen i kraftfôrautomaten.

3.1.6 Registreringer, prøvetaking og analyser

De fleste registreringer og prøvetakinger ble gjort siste uke i hver periode (heretter benevnt prøveuke). Prøver av blod og melk fra hvert individ ble tatt ut én gang per periode. Dette utgjorde til sammen 95 prøver. Ku nr 5524 måtte avsines i periode 4 på grunn av lav melkeproduksjon, og det ble derfor ikke tatt prøver av denne kua i periode 4. Tabell 10 viser en oversikt over prøvetaking og faste hendelser i forsøket.

Tabell 10: Oversikt over prøvetaking og faste hendelser i forsøket. Dette ble gjentatt i alle periodene.

Uke	Mandag	Tirsdag	Onsdag	Torsdag	Fredag
1	Skifte av forsøksblanding		Registrering av kuvekt		Registrering av kuvekt
4	Melkeprøver kl 06.00 og kl 15.00 Fôrprøver og restep prøver	Melkeprøver kl 06.00 og kl 15.00 Fôrprøver	Blodprøver kl 06.00 Melkeprøver blandet og sendt til TINE Fôrprøver og restep prøver Registrering av kuvekt.	Holdvurdering Fôrprøver	Fôrprøver og restep prøver. Registrering av kuvekt.

Registrering av fôropptak

Automatiske fôrkar av typen BioControl AS BS 40 registrerte daglig grovfôropptak. Fôrkarene hadde en innebygd vekt som veide innholdet i fôrkarene kontinuerlig. Hver ku var utstyrt med en transponder med kuas indentifikasjonsnummer som var festet i halsbåndet. Denne transponderen gav kyrne tilgang til fôrkarene og differanse i fôrmengde ble registrert for hvert besøk.

Opptak av grunnfôr ble registrert i kraftfôrautomatene. Kraftfôrautomatene gjenkjenner også transponderen. Transponderen var knyttet til en dataoperatør som hadde informasjon om hvor mye grunnfôr hver enkelt ku skulle få i løpet av et døgn. Dersom det var for kort tid siden forrige besøk i kraftfôrautomaten fikk ikke kyrne tilgang til mer grunnfôr. Dersom kua ikke besøkte kraftfôrautomaten innen det definerte tidsrommet ble det gitt beskjed til operatøren.

For å kunne beregne opptak av forsøksblandingene ble restene av forsøksblandingene veid.

Fôrprøver

I hver prøveuke ble det tatt prøver av surfôr, grunnfôr og forsøksfôr. Surfôrprøver ble tatt ut hver dag i hver prøveuke ved å plukke en representativ prøve fra alle fôrkarene like etter utfôring. Prøver av grunnfôr og forsøksblandingene ble tatt ut mandag, onsdag og fredag i hver prøveuke ved å plukke en representativ prøve fra beholdningen av disse fôrmidlene. Det ble tatt ut

restepøver av surfôr i periode 2, 3 og 4, mandag, onsdag og fredag hver prøveuke ved oppsamling av alle rester og uttak av en representativ prøve. Rester av forsøksfôr som var blandet med grunnfôr ble samlet opp kvantitativt for hver ku som hadde rester i periode 2, 3 og 4. I periode 1 ble det tatt ut en representativ prøve av restene av forsøksblandingene for hver ku som hadde rester. Fôrprøvene ble frosset ned til de skulle prepareres.

Før preparering ble alle prøvene av surfôr fra samme periode blandet. Det samme ble gjort for prøvene av grunnfôr, forsøksblandingene og rester av surfôr. Restene av forsøksblandingene som var blandet med grunnfôr ble samlet i en prøve for alle kyr som hadde fått samme forsøksblanding i samme periode. Mengden rester for hver ku ble veid og mengden ble vektet slik at restene bestod av størst andel fra kyrne som hadde mest rester. Eksempel på hvordan mengden rester som ble tatt ut i prøven ble bestemt er vist i Tabell 11.

Tabell 11: Eksempel på beregning av restepøve for hver ku som hadde fått samme forsøksblanding i samme periode. Mengden rester som ble tatt ut til restepøven er vektet etter hvor mye rester den enkelte ku hadde.

Ku nr:	Rester, g	% av rester totalt	Andel av 500 g prøve, g
1	300	15	75
2	550	27,5	137,5
3	1100	55	275
4	50	2,5	12,5
Totalt	2000	100	500

Surfôrprøvene og restepøvene av surfôr ble hakket, veid inn i aluminiumsbakker og deretter frysetørket. Grunnfôr, forsøksblandingene og rester av forsøksblandingene (blandet med grunnfôr) ble også veid inn i aluminiumsbakker og frysetørket. Etter frysetørring ble prøvene luftekvilibrert i minimum 24 timer og deretter veid tilbake. Prøvene ble malt på 1mm sold i en Retsch kuttemølle. Malte prøver ble fordelt på 3 plastposer. Prøvene ble videre analysert ved ulike laboratorium som vist i Tabell 12. Råprøver av surfôr fra de 4 periodene ble sendt til Eurofins, Moss, for analyse.

Tabell 12: Oversikt over fôranalyser av de ulike fôrprøvene med sted for analyse.

Prøvetype	Antall prøver	Analysested	Analyse
Surfôr rå	4	Eurofins, Moss.	Tørrstoff, aske, protein, bufferløselig råprotein, NDF ¹ , iNDF ² .
Surfôr frysetørket	4	Århus Universitet, Foulum, Tjele.	Fett, α -tokoferol og stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol.
Surfôr frysetørket	4	Eurofins, Moss.	Tørrstoff, aske, protein, bufferløselig råprotein, NDF ¹ , iNDF ² .
Restep prøve surfôr frysetørket	3	Århus Universitet, Foulum, Tjele.	Fett, α -tokoferol og stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol.
Restep prøve surfôr frysetørket	3	Eurofins, Moss.	Tørrstoff, aske, protein, bufferløselig råprotein, NDF ¹ , iNDF ² .
Grunnfôr	4	Århus Universitet, Foulum, Tjele.	Fett, α -tokoferol og stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol.
Grunnfôr	4	Eurofins, Moss.	Tørrstoff, aske, protein, bufferløselig nitrogen, fett, NDF ¹ og stivelse.
Forsøksblandinger	16	Århus Universitet, Foulum, Tjele.	Fett, α -tokoferol og stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol.
Forsøksblandinger	16	Eurofins, Moss.	Tørrstoff, aske, protein, bufferløselig nitrogen, fett, NDF ¹ og stivelse.
Restep prøver forsøksblandinger (blandet med grunnfôr)	12	Århus Universitet, Foulum, Tjele.	Fett, α -tokoferol og stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol.
Restep prøver forsøksblandinger (blandet med grunnfôr)	12	Eurofins, Moss.	Tørrstoff, aske, protein, bufferløselig nitrogen, fett, NDF ¹ og stivelse.

¹ NDF = nøytralløselig fiber² iNDF = ufordøyelig nøytralløselig fiber

Tilleggsprøver av fôr

Etter at forsøket var avsluttet indikerte resultatene at forsøksblandingene ikke hadde forventet sammensetning. Dette gjorde det nødvendig å analysere prøver av vitamin E-tilsetningene og forsøksblandingene før pelletering. Prøver av tangmel og de naturlig og syntetisk vitamin E-produktene som ble tilsatt i forsøksblandingene ble hentet fra rester etter produksjonen av fôret. Prøver av forsøksblandingene før pelletering ble hentet ut hos fôrprodusenten (Fôrtek, UMB). Disse prøvene ble sendt til Foulum forskningssenter og analysert for innhold av α -tokoferol og stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol. En ekstra prøve av tangmelet ble tatt ut og analysert for fett, stivelse, aske, protein, NDF og tørrstoff på laboratoriet ved Institutt for Husdyr og Akvakultur ved UMB.

Registrering av vekt

Kyrne ble veid på en automatisk vekt plassert ved utgangen til melkegrava slik at dyrene måtte passere denne etter melking. Vekt ble registrert dag 3, 5, 24 og 26 i hver periode.

Holdvurdering

Holdvurdering ble utført torsdag eller fredag i hver prøveuke. Holdvurdering ble utført ved visuell vurdering av 8 bedømmelsespunkter. Disse bedømmelsespunktene var ryggtakker, området mellom rygg og sidetakker, sidetakker, halegrop, området mellom hofteknokke og setebeinsknoke, område mellom setebeinsknoke og hoftebein og området mellom hofteknokene. Det ble gitt en samlet vurdering ut fra fettavleiringen på disse punktene. Holdpoeng ble gitt som beskrevet av Gillund et al. (2000).

Registrering av melkeytelse og uttak av melkeprøver

Forsøksdyrene ble melket to ganger daglig, kl 06:00 og kl 15:00, i melkegrav og melkeytelse ble registrert automatisk for hver melking. Melkeprøver ble tatt ut av personalet ved SHF, mandag morgen og kveld og tirsdag morgen og kveld. Totalt fire prøver for hver ku i hver periode. Prøvene ble kjølt ned etter uttak. Onsdag formiddag i prøveukene ble prøvene varmet opp til 15 grader i vannbad og deretter ble alle prøvene for samme ku blandet. Disse prøvene ble igjen delt på fire olabeger for å sendes til ulike laboratorier for analyse. To av prøvene ble tatt vare på som reserveprøve. Tabell 13 viser en oversikt over analyser og analysested for melkeprøvene.

Tabell 13: Analyser og analysested for melkeprøver.

Analysested	Analyse	Antall prøver
TINE Brumunddal	Fett, protein, laktose, urea, frysepunkt, frie fettsyrer og celler.	95
Århus universitet	α -tokoferol, stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol	95

Blodprøver

Det ble tatt blodprøver av hver ku for hver periode av forsøket. Prøvene ble tatt onsdag morgen kl 06.00 i hver prøveuke fortløpende etter hvert som hver enkelt ku var ferdig med å melke. Det ble tatt ut ett prøveglass med 10 ml blod fra halsvena. Prøven ble sentrifugert og plasma ble tatt ut ved laboratoriet ved IHA. Disse ble så frosset ned og oppbevart til forsøket var slutt. Deretter ble de sendt til Foulum forskningscenter, Århus universitet, Danmark for analyse av α -tokoferol og stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol.

3.1.7 Analysemetoder

Analyser ved Eurofins, Moss.

Alle fôrprøver ble analysert ved Eurofins, Moss for næringsstoffene vist i Tabell 14. Analysene ble utført etter standard analysemetoder ved Eurofins (Eurofins 2012)

Tabell 14: Analyser utført ved Eurofins, Moss.

Analyse	Råprøve surfôr	----- Frysetørket -----		
		Surfôr og restep prøve av surfôr	Grunnfôr og restep prøve av grunnfôr	Forsøksblandingene og restep prøve av forsøksblandingene
Vann	X	X	X	X
Aske	X	X	X	X
Protein N*6,25	X	X	X	X
Bufferløselig råprotein	X	X		
Bufferløselig nitrogen			X	X
Fett			X	X
NDF ¹	X	X	X	X
iNDF ²	X	X		
Stivelse			X	X

¹NDF = nøytralløselig fiber

² iNDF = ufordøyelig nøytralløselig fiber

Analyser ved TINE distriktslaboratoriet i Brumunddal

Alle melkeprøver ble analysert ved distriktslaboratoriet til TINE i Brumunddal. Melka ble analysert for fett, protein, laktose, urea, frysepunkt og celletall på en CombiFoss 6000 fra FossElectric, Danmark (TINE 2012).

Analyser ved Foulum forskningscenter, Århus Universitet, Tjele, Danmark.

Analyser av fett, innhold α - tokoferol og stereoisomerfordeling av α - tokoferol ble utført ved Foulum forskningscenter Århus Universitet, Tjele, Danmark i januar 2012. Prøvene ble beskyttet fra lys under behandling. Vann brukt til analysene ble filtrert ved Milli-Q 185 filter levert av Millipore S.A.S. (Molsheim, Frankrike). Prøvene ble sentrifugert ved Thermo Scientific SL40 sentrifuge. Inndamping foregikk i en Supertherm vaporizer fra Mikrolab Århus A/S (Højbjerg, Danmark). Ascorbinsyreløsning 20 % ble laget hver uke ved å løse opp 40 g askorbinsyre i 200 ml destillert vann og lagret lysfritt. Alle prøver som ble analysert etter HPLC metoden, ble kjørt i en Perkin Elmer series 200 autosampler. Alle prøver som ble analysert etter GC metoden, ble kjørt i en Hewlett Packard GC system, HP 6890 series.

Analyse av fett i fôr

250 mg av 41 frysetørkede fôrprøver ble veid ut og overført til et 10 ml kulturglass. Det ble tilsatt 1,5 ml 3M HCl til hvert glass før prøvene ble satt i 80 °C vannbad i 1 time. 3 ml metanol, 0,5 ml kloroform og 1 ml kloroform med 5 mg/ml standard ble tilsatt hver prøve. Disse ble ristet og deretter tilsatt 2,5 ml kloroform og 1,5 ml ELGA-vann. Prøvene ble så sentrifugert i 10 minutter ved 3000 omdreininger per minutt (rpm). Etter sentrifugering ble kloroformfasen, som da var nederst i glasset, ekstrahert over et kulturglass som var veid på forhånd. Prøvene ble veid igjen, og så inndampet til eksakt tørrhet under N₂ ved 50 °C. Deretter ble prøvene tørket i tørkeskap på 100 °C i 2 timer. Etter tørking ble prøvene veid nok en gang og fettprosent ble beregnet.

Analyse av α -tokoferol-innhold

Plasma

500 μ l plasma av totalt 95 plasmaprøver (24 for hver periode, minus 1 i periode 4) ble overført i kulturglass. Hvert glass ble tilsatt 2 ml etanol (C_2H_5OH), 0,5 ml metanol (CH_3OH), 1 ml askorbinsyreløsning 20 %, 0,3 ml kaliumhydroksid (KOH) og 1,2 ml destillert vann (H_2O). Prøvene ble forsåpet ved 80 °C vannbad i 20 minutter før videre avkjøling. Deretter ble prøvene ekstrahert 2 ganger med 5 ml heptan over i rene kulturglass etter å ha blitt sentrifugert ved 3000 rpm i 10 minutter. 1 ml av heptanfasen ble overført til hetteglass og analysert ved HPLC som beskrevet av Jensen & Lauridsen (2007). 8 ml av heptanfasen ble overført til rent kulturglass og videre brukt til stereoisomeranalyse (se analyse av stereoisomerfordeling).

Melk

95 melkeprøver (24 for hver periode, minus 1 i periode 4) ble tint ved 40 °C vannbad før 1 ml av melken ble overført i kulturglass. Deretter ble prøvene behandlet på samme måte som plasmaprøvene bortsett fra at det kun ble tilsatt 0,7 ml vann (H_2O).

Fôr

2 gram av 41 frysetørkede fôrprøver ble veid inn i kolbeglass. Disse ble tilsatt 70 ml etanol (C_2H_5OH), 30 ml metanol (CH_3OH), 30 ml askorbinsyreløsning 20 %, 20 ml kaliumhydroksid (KOH). Prøvene ble forsåpet ved 80 °C i 30 minutter før videre avkjøling. 2 ml av prøven ble overført i kulturglass og 1 ml vann ble tilsatt. Resten av analysen er lik som for plasma.

Analyse av stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol

Fremgangsmåten for analyse av stereoisomerfordistribusjon av α -tokoferol var lik for alle prøvene fra plasma, melk og fôr. Ca 8 ml av heptanfasen ekstrahert ved analyse av α -tokoferolinnhold ble inndampet til eksakt tørrhet under N_2 ved 50 °C. Alle prøvene ble tilsatt 50 μ l Etylen Glykol Dimetyl Eter ($CH_3-O-CH_2CH_2-O-CH_3$) og 25 μ l KOH. Glasset ble fylt med argon og 45 μ l dimetylsulfat ble tilsatt. Prøvene ble ristet i 1 time på en IKA-VIBRAX-VXR (produsert av Janke & Kenkel). Etter risting ble prøvene igjen inndampet. Deretter ble det tilsatt 100 μ l H_2O og 1,5 ml heptan. Prøvene ble ristet på vortexer og sentrifugert i 10 minutter på 3000 rpm. Ca. halvparten av øverste lag ble så overført til hetteglass og analysert ved HPLC som beskrevet av Jensen & Lauridsen (2007).

Tilleggsanalyser

Prøvene av vitamin E-produktene (tangmel, naturlig vitamin E og syntetisk vitamin E) og prøvene av forsøksblandingene før pelletering ble analysert for α -tokoferol og stereoisomerfordistribusjon på samme måte som de andre fôrprøvene (beskrevet ovenfor).

Analyser på laboratoriet ved Institutt for Husdyr og Akvakultur (IHA)

Tangmel ble analysert for tørrstoff, aske, råprotein, NDF, råfett og stivelse etter standard analysemetoder på Ernæringslaboratoriet, IHA, UMB (Nordberg 2008).

Analysene ble utført etter følgende metodespesifikasjoner:

Analyse av tørrstoff, IHA-nr.: msp-1044 Tørrstoff

Analyse av aske, IHA-nr.: msp-1038 Aske

Analyse av råprotein (Kjeldahl-N), IHA-nr.: Msp-1040 Kjeldahl-N

Analyse av NDF, IHA-nr.: 1041

Analyse av råfett, IHA-nr.: MSP 1045

Analyse av stivelse, IHA-nr.: MSP 1159

3.1.8 Beregninger

Tilsynelatende gjenfinningsgrad i melk (Tabell 23)

Tilsynelatende gjenfinningsgrad er beregnet ved Formel 1:

$$\frac{M * \alpha M}{o * 100} \quad \text{Formel 1}$$

M = melkemengde (l/dag)

αM = α -tokoferol i melk (l/dag)

o = opptak av α -tokoferol (mg/dag)

Relativ biotilgjengelighet (Tabell 24)

Forskjell i relativ biotilgjengelighet i melk og plasma mellom rasjon med naturlig vitamin E og rasjon med syntetisk vitamin E, korrigert for opptak av α -tokoferol er beregnet ved Formel 2:

$$\frac{\alpha Nat / \alpha Synt}{o Nat / o Synt} \quad \text{Formel 2}$$

Definisjon av leddene i Formel 2 er presentert etter Formel 3.

Forskjell i relativ biotilgjengelighet i melk og plasma ved økning i forhold til kontroll er beregnet ved Formel 3:

$$\frac{(\alpha Nat - \alpha Kont) / (\alpha Synt - \alpha Kont)}{(o Nat - o Kont) / (o Synt - o Kont)} \quad \text{Formel 3}$$

αNat = konsentrasjon av α -tokoferol i melk/plasma (mg/l) etter tilskudd av blanding med naturlig vitamin E.

$\alpha Synt$ = konsentrasjon av α -tokoferol i melk/plasma (mg/l) etter tilskudd av blanding med syntetisk vitamin E.

$\alpha Kont$ = konsentrasjon av α -tokoferol i melk plasma (mg/l) etter tilskudd av kontrollblanding.

$o Nat$ = opptak av α -tokoferol (mg/dag) etter tilskudd av blanding med naturlig vitamin E.

$o Synt$ = opptak av α -tokoferol (mg/dag) etter tilskudd av blanding med syntetisk vitamin E.

$o Kont$ = opptak av α -tokoferol (mg/dag) etter tilskudd av kontrollblanding.

Samme formel kan brukes for å beregne økning i forhold til tangmel ved å sette inn verdiene for tangmel i stedet for kontroll.

Relativ biotilgjengelighet for de ulike stereoisomerene (Tabell 25 og 26)

Andel av de enkelte stereoisomerene i fôr er beregnet ved Formel 4:

$$\frac{(\alpha S * sS) + (\alpha G * sG) + (\alpha F * sF)}{o} \quad \text{Formel 4}$$

αS = α -tokoferol i surfôr (mg/kg)

sS = andel stereoisomer i surfôr (%)

αG = α -tokoferol i grunnfôr (mg/kg)

sG = andel stereoisomer i grunnfôr (%)

αF = α -tokoferol i forsøksblanding (mg/kg)

sF = andel stereoisomer i forsøksblanding (%)

o = opptak av α -tokoferol (mg/dag)

Forhold mellom plasma og fôr, og melk og fôr er beregnet ved Formel 5 og Formel 6:

$$\frac{sPlasma}{sFôr} \quad \text{Formel 5}$$

$$\frac{sMelk}{sFôr} \quad \text{Formel 6}$$

$sPlasma$ = andel stereoisomerer i plasma (%)

$sMelk$ = andel stereoisomerer i melk (%)

$sFôr$ = andel stereoisomerer i fôr (%)

Relativ biotilgjengelighet av de ulike stereoisomerene av α -tokoferol er beregnet i forhold til tilgjengeligheten av RRR- α -tokoferol. Derfor er RRR- α -tokoferol satt til å være 100 % tilgjengelig og de andre stereoisomerene er beregnet i forhold til denne ved Formel 7 for plasma og Formel 8 for melk.

$$\frac{\text{Forhold plasma/fôr}}{RRR} * 100 \quad \text{Formel 7}$$

$$\frac{\text{Forhold melk/fôr}}{RRR} * 100 \quad \text{Formel 8}$$

Forhold plasma/fôr = beregnet ved formel 5

Forhold melk/fôr = beregnet ved formel 6

RRR = tilgjengelighet av RRR- α -tokoferol (100 % tilgjengelig)

Relativ biotilgjengelighet av all-rac- α -tokoferol i forhold til RRR- α -tokoferol er beregnet ved Formel 9:

$$\sum(B * S) \quad \text{Formel 9}$$

B = relativ biotilgjengelighet for hver enkelt stereoisomer i forhold til RRR.

S = andel av den enkelte stereoisomer i all-rac- α -tokoferol (%).

Forhold for relativ biotilgjengelighet mellom RRR- α -tokoferol og all-rac- α -tokoferol er beregnet ved Formel 10:

$$\frac{RRR}{all-rac} \quad \text{Formel 10}$$

RRR = relativ biotilgjengelighet av RRR- α -tokoferol (100 %).

all-rac = relativ biotilgjengelighet av all-rac- α -tokoferol i forhold til RRR- α -tokoferol.

3.1.9 Statistisk modell

Alle data ble analysert ved hjelp av en blandet modell i prosedyren MIXED i SAS (SAS 2009). Modellen var $Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + S_k + K(S)_{kl} + \varepsilon_{ijkl}$. μ var den generelle middelværdi, α_i var effekt av periode, β_j var effekt av forsøksblanding, $(\alpha\beta)_{ij}$ var samspilleffekt mellom periode og forsøksblanding, S_k var effekt av kvadrat, $K(S)_{kl}$ var effekt av dyr innen kvadrat og ε_{ijkl} var tilfeldige feil. I modellen ble forsøksblanding og periode behandlet som faste effekter, mens kvadrat og ku innen kvadrat ble behandlet som tilfeldige effekter. ”Restricted maximum likelihood” metode (Lynch & Walsh 1998) ble brukt til å estimere varianskomponentene. ”Sattershwaite’s” metode ble brukt til å estimere frihetsgrader og Tukeys test ble brukt til å skille mellom gjennomsnittsverdier for forsøksblandingene (Engstrand & Olsson 2003). Statistisk signifikant nivå ble satt til $< 0,05$.

3.2 Resultater

3.2.1 Kjemisk sammensetning av fôret

Kjemisk sammensetning av tangmel er presentert i Tabell 15. Tangmel hadde et høyt innhold av aske sammenlignet med vanlige fôrmidler til melkekyr. Innholdet av nøytralløselige fiber (NDF) var omtrent på nivå med NDF-innholdet i surfôr, men var betydelig høyere enn i havre og bygg (Fôrtabellen 2008). Innholdet av protein og stivelse i tangmelet var relativt lavt sammenlignet med havre og bygg, mens fettinnholdet var høyere. Tangmelet hadde en stor analyserest som sannsynligvis i hovedsak bestod av andre karbohydrater enn NDF og stivelse. Tangmel har normalt et relativt høyt innhold av karbohydrater som alginsyre, mannitol og laminaran (Jensen et al. 1968). Forventet α -tokoferolinnhold i tangmelproduktet brukt i forsøket var ca. 90 mg/kg tørrstoff (TS), basert på gjennomsnittsverdien fra et forsøk av Jensen (1969). Analyse av tangmelet viste et innhold på 61 mg/kg TS, noe som er litt lavere enn gjennomsnittet, men likevel innenfor normal variasjon i grisetang.

Tabell 15: Kjemisk sammensetning av rent tangmel.

----- g/kg TS ^a -----							
TS ^a %	Aske	Råprotein	Stivelse	NDF ^b	Råfett	Analyserest	α -tokoferol mg/kg TS ^a
86,4	244	53	8,1	395	28,1	271,8	61

^a TS = tørrstoff

^b NDF = nøytralløselig fiber

Kjemisk sammensetning av forsøksfôret er presentert i Tabell 16. Surfôret hadde et tørrstoffinnhold på 28,7 % og et NDF-innhold på 487,3 g/kg TS. Blanding med tangmel skilte seg fra de andre forsøksblandingen med et høyere innhold av fett og NDF og et lavere innhold av stivelse. Dette er ventet på grunn av den kjemiske sammensetningen av tangmel (Tabell 15)

Tabell 16: Kjemisk sammensetning av forsøksfôret.

Fôr	Surfôr	Grunnfôr ^a	----- Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E ----			
			Tangmel	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E	Kontroll
TS ^b %	28,7	87,5	86,6	87,9	89,3	88,0
Gram/kg TS ^b						
Aske	77,5	37,1	207,2	218,5	219,4	212,6
Protein	121,0	163,3	88,8	87,8	85,4	86,5
Bufferløselig						
nitrogen % av N ^c	52,2	31,5	14,4	14,4	14,9	14,6
Fett	51,9	81,1	27,0	31,4	28,3	22,9
NDF ^d	487,3	287,2	227,9	137,1	132,8	136,8
Stivelse	0	351,2	287,3	433,5	436,2	443,0

^a Sammensetning av grunnfôr: havre (75,9 %), rapsfrø (3,9 %), soyakaker (15,2 %) og rørmelasse (5 %)

^b TS = tørrstoff.

^c N = nitrogen.

^d NDF = nøytralløselig fiber.

3.2.2 Fôrets innhold av α -tokoferol

Innholdet av α -tokoferol i forsøksfôret er presentert i Tabell 17 sammen med fordeling av de ulike stereoisomerene. Alle forsøksblandingene hadde et lavt innhold av α -tokoferol i forhold til hva som var forventet. Blandingen med 30,5 % tangmel hadde 4,4 mg/kg TS, mens kontrollblandingen som ikke skulle tilsettes vitamin E, hadde 79,3 mg/kg TS. Distribusjonen av de ulike stereoisomerene viser at alle blandingene hadde en betydelig andel syntetiske stereoisomerer i seg, selv om det i utgangspunktet kun var blanding med syntetisk vitamin E som skulle inneholde syntetiske stereoisomerer. Disse resultatene var uventet og skyldes sannsynligvis feil under produksjonen av forsøksblandingene. Konsekvensene av dette vil bli diskutert i kapittel 3.3 (Diskusjon).

Tabell 17: Innhold av α -tokoferol i forsøksfôret, samt fordeling av de ulike stereoisomerene (% av α -tokoferol).

	-----Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E-----					
	Surfôr	Grunnfôr ^a	Tangmel	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E	Kontroll
α -tokoferol mg/kg TS ^b	39	7,9	4,4	930	1052	79,3
<i>Fordeling %</i>						
2S ^c	0	-	11,0	51,1	5,9	18
RSS ^c	0	-	10,7	12,5	0,5	3,1
RRS ^c	0	-	12,3	12,5	4	3,6
RRR ^c	100	-	50,1	11,7	89	72,5
RSR ^c	0	-	15,9	12,2	0,6	2,8

^a Det var ikke mulig å bestemme stereoisomerfordeling i grunnfôr.

^b TS = tørrstoff.

^c Forkortelsene beskriver stereokjemisk struktur av α -tokoferol og forteller hvilken konfigurasjon det er i de tre kirale senterne, henholdsvis i posisjon 2, 4 og 8. Alle forkortelsene har endelse – α -tokoferol. 2S er forkortelse for alle isomerene som har S konfigurasjon i 2. posisjon (SSS, SRR, SRS, SRR).

Tabell 18 viser innhold av α -tokoferol i vitamin E produktene, og forsøksblandingene før og etter pelletering. Innholdet av α -tokoferol i forsøksblandingene ble redusert med mellom 55 % og 73 % under pelletering. Innhold av α -tokoferol i det syntetiske vitamin E produktet var ca. 20 % lavere enn forventet.

Tabell 18: Innhold av α -tokoferol i vitamin E produktene og forsøksblandingene før og etter pelletering

	---- Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E ----			
	Tangmel	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E	Kontroll
Menge tilsatt %	30,5	0,759	1,259	0
<i>α-tokoferol mg/kg TS^a</i>				
Forventet innhold i produkt	Ca 90	500000	300000	-
Innhold i produkt	61	395725	294855	0
Forventet innhold i forsøksblanding ^b	19	3004	3712	0-10
Innhold i forsøksblanding før pelletering	16	2834	2686	175
Innhold i forsøksblanding etter pelletering	4,4	930	1052	79,5
Reduksjon ved pelletering %	73	69	61	55

^a TS = tørrstoff.

^b Forventet innhold ut i fra det faktiske innholdet av α -tokoferol i tilsetningsproduktet.

Distribusjon av de ulike stereoisomene av α -tokoferol i forsøksblandingene før og etter pelletering er presentert i Tabell 19. Tilsetningene av vitamin E hadde forventet distribusjon, men forsøksblandingene hadde en betydelig mengde syntetiske stereoisomerer også før pelletering. Dette vil bli diskutert i kapittel 3.3 (Diskusjon). Det var liten forskjell i stereoisomerdistribusjon før og etter pelletering.

Tabell 19: Stereoisomerfordistribusjon for de ulike blandingene før og etter pelletering

	2S ^a	RSS ^a	RRS ^a	RRR ^a	RSR ^a
<i>Tangmel</i>					
Tangmelprodukt	0	0	0	100	0
Forsøksblanding malt	15,1	9,6	12,3	47,8	15,1
Forsøksblanding pelletert	11,0	10,7	12,3	50,1	15,9
<i>Syntetisk vitamin E</i>					
Tilsetningsprodukt	55,2	10,3	9,9	12,1	12,5
Forsøksblanding malt	51,7	12,4	12,1	11,8	11,9
Forsøksblanding pelletert	51,1	12,5	12,5	11,7	12,2
<i>Naturlig vitamin E</i>					
Tilsetningsprodukt	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
Forsøksblanding malt	5,9	1,0	2,5	90,0	0,5
Forsøksblanding pelletert	5,9	0,5	4	89	0,6
<i>Kontroll</i>					
Kontroll malt	10,5	1,9	3,7	81,4	2,5
Kontroll pelletert	18	3,1	3,6	72,5	2,8

^aForkortelsene beskriver stereokjemisk struktur av α -tokoferol og forteller hvilken konfigurasjon det er i de tre kirale senterne, henholdsvis i posisjon 2, 4 og 8. Alle forkortelsene har endelse – α -tokoferol. 2S er forkortelse for alle isomerene som har S konfigurasjon i 2. posisjon (SSS, SRR, SRS, SRR).

3.2.3 Opptak av fôr

Opptak av fôr for de ulike behandlingene er presentert i Tabell 20. Det var ingen signifikant forskjell i surfôropptak mellom behandlingene. Derimot var opptaket av forsøksblandingen med tangmel, samt av grunnfôret for kyrne som fikk blandingen med tangmel, signifikant høyere enn for de andre forsøksblandingene, men ikke i forhold til kontrollblandingen. Som ventet ut fra innhold av α -tokoferol (Tabell 17) gav blandingen med tangmel og kontrollblandingen lavere opptak av α -tokoferol enn blandingen med naturlig og blandingen med syntetisk vitamin E.

Tabell 20: Opptak av de ulike forsøksfôrene og opptak av α -tokoferol beregnet ut fra innhold av α -tokoferol i de ulike forsøksfôrene.

	----- Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E -----				SE ¹	P-verdi
	Tangmel	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E	Kontroll		
<i>TS² opptak kg/dag</i>						
Surfôr	14,6	14,8	14,9	14,8	0,55	0,9509
Grunnfôr	2,99 ^a	2,85 ^b	2,88 ^b	2,92 ^{ab}	0,047	0,0199
Forsøksblanding	0,63 ^a	0,51 ^b	0,52 ^b	0,55 ^b	0,016	< 0,0001
Total	18,2	18,2	18,3	18,3	0,51	0,9957
Rester, kg/dag	0,07 ^b	0,26 ^a	0,24 ^{ab}	0,17 ^{ab}	0,063	0,0384
<i>α-tokoferol-opptak mg/dag</i>						
Surfôr	568	577	579	576	21,7	0,9509
Grunnfôr	23,6 ^a	22,5 ^b	22,7 ^{ab}	23,0 ^{ab}	0,38	0,0199
Forsøksfôr	3,2 ^c	476 ^b	550 ^a	43,5 ^c	14,3	< 0,0001
Total	598 ^c	1075 ^b	1151 ^a	643 ^c	16,7	<0,0001
Total mg/kg kroppsvekt	1,04 ^d	1,91 ^b	2,02 ^a	1,15 ^c	0,039	<0,0001
RRR- α -tokoferol mg/dag	597 ^c	655 ^b	1091 ^a	631 ^b	17,2	<0,0001
Andre stereoisomerer mg/d	1 ^c	420 ^a	60 ^b	12 ^c	7,4	<0,0001

Ulike bokstaver i hevet skrift viser signifikant forskjell mellom forsøksblandingene.

¹ SE = standardfeil

² TS = tørrstoff.

3.2.4 Hold og vekt

Kyrne økte i vekt utover i forsøket med et gjennomsnitt på ca. 20 kg per ku i hver periode. Det var ingen signifikant effekt av forsøksblanding. Totalt var det en gjennomsnittlig økning med nesten 0,3 holdpoeng per ku fra periode 1 til periode 4.

3.2.5 Melkeytelse og innhold av fett og α -tokoferol i plasma og melk

Tabell 21 viser ytelse, innhold av fett i melka, samt innhold av α -tokoferol i plasma og melk. Det var ingen signifikant forskjell i melkemengde mellom behandlingene. Derimot gav blandingen med naturlig vitamin E og kontrollblandingen signifikant høyere fettinnhold i melka enn blandingene med tangmel og syntetisk vitamin E. Innholdet av α -tokoferol i mg/kg melkefett og i plasma var signifikant høyere ved tildeling av blanding med naturlig vitamin E enn for de andre blandingene. Blanding med syntetisk vitamin E gav signifikant høyere innhold av α -tokoferol i mg/kg melkefett og i plasma enn blandingen med tangmel og kontrollblandingen. Det var ingen signifikant forskjell mellom blandingen med tangmel og kontrollblandingen.

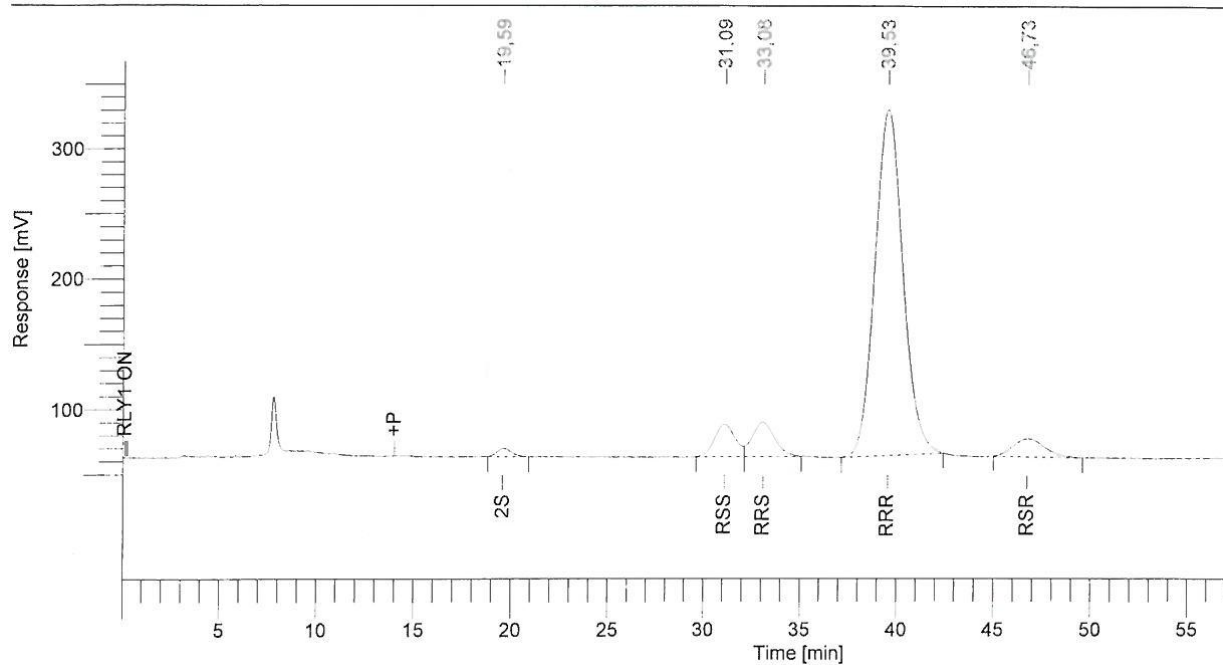
Tabell 21: Melkeytelse, fettinnhold i melka og innhold av α -tokoferol i melk og plasma

	-----Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E-----				SE ¹	P-verdi
	Tangmel	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E	Kontroll		
<i>Melk</i>						
Melk, kg/d	16,1	16,3	15,9	15,7	0,63	0,3944
Fett g/kg	41,2 ^b	41,1 ^b	42,5 ^{ab}	42,7 ^a	1,23	0,0470
<i>α-tokoferol</i>						
α -tokoferol, mg/kg fett	27,6 ^c	30,5 ^b	35,3 ^a	28,0 ^c	1,17	< 0,0001
α -tokoferol, mg/l	1,14 ^c	1,25 ^b	1,50 ^a	1,20 ^{bc}	0,052	< 0,0001
RRR-tokoferol, mg/l	1,14 ^{bc}	1,09 ^c	1,47 ^a	1,20 ^b	0,050	< 0,0001
Andre stereoisomerer, mg/l	0,003 ^b	0,16 ^a	0,03 ^b	0,007 ^b	0,011	< 0,0001
<i>Plasma, mg/l</i>						
α -tokoferol	10,13 ^c	11,27 ^b	13,17 ^a	9,99 ^c	0,593	< 0,0001
RRR- α -tokoferol	10,04 ^b	9,69 ^b	12,82 ^a	9,83 ^b	0,544	< 0,0001
Andre stereoisomerer	0,07 ^c	1,58 ^a	0,35 ^b	0,16 ^{bc}	0,099	< 0,0001

Ulike bokstaver i hevet skrift viser signifikant forskjell mellom forsøksblandingene.

¹ SE = standardfeil.

Stereoisomerfordelingen i plasma og melk ble bestemt ut fra kromatografier fra analyse med HPLC. Eksempel på et slikt kromatografi er vist i Figur 6. Andelen av de ulike stereoisomerene ble bestemt ved å beregne arealet på toppene på kromatografiet.



Figur 6: Eksempel på kromatografi fra analyse med HPLC. Kromatografiet er plasmaprøve fra ku nr. 5567 i periode 2 med tilskudd av syntetisk vitamin E.

Distribusjon av de ulike stereoisomerene i plasma og melk er vist i Tabell 22. Blanding med tangmel gav signifikant større andel RRR- α -tokoferol i plasma enn de andre forsøksblandingene, men i melk var det ingen forskjell mellom blanding med tangmel, blanding med naturlig vitamin E og kontrollblandingen. Blandingen med syntetisk vitamin E gav signifikant lavere innhold av RRR- α -tokoferol enn alle de andre forsøksblandingene, både i plasma og melk. Blanding med syntetisk vitamin E gav signifikant større prosentandel av 2S- α -tokoferoler, i plasma og melk, enn de andre forsøksblandingene.

Tabell 22: Distribusjon av ulike stereoisomerer i plasma og melk i % av α -tokoferolinnhold.

----- Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E -----						
	Tangmel	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E	Kontroll	SE ¹	P-verdi
Plasma, %						
RRR ²	99,2 ^a	86,6 ^c	97,4 ^b	98,4 ^{ab}	0,54	< 0,0001
RSS ²	0,2 ^c	4,1 ^a	0,8 ^b	0,4 ^{bc}	0,18	< 0,0001
RRS ²	0,3 ^c	4,8 ^a	1,1 ^b	0,7 ^{bc}	0,21	< 0,0001
RSR ²	0,2 ^c	3,6 ^a	0,6 ^b	0,4 ^{bc}	0,15	< 0,0001
2S ²	0,1 ^b	1,0 ^a	0,1 ^b	0,1 ^b	0,04	< 0,0001
Melk, %						
RRR ²	99,6 ^a	87,4 ^b	97,9 ^a	99,4 ^a	0,67	< 0,0001
RSS ²	0,1 ^b	3,4 ^a	0,4 ^b	0,1 ^b	0,16	< 0,0001
RRS ²	0,1 ^b	3,9 ^a	0,7 ^b	0,2 ^b	0,24	< 0,0001
RSR ²	0,1 ^b	3,8 ^a	0,7 ^b	0,2 ^b	0,24	< 0,0001
2S ²	0,1 ^c	1,5 ^a	0,3 ^b	0,1 ^c	0,08	< 0,0001

Ulike bokstaver i hevet skrift viser signifikant forskjell mellom forsøksblandingene.

¹ SE = standardfeil

² Forkortelsene beskriver stereokjemisk struktur av α -tokoferol og forteller hvilken konfigurasjon det er i de tre kirale senterne, henholdsvis i posisjon 2, 4 og 8. Alle forkortelsene har endelse – α -tokoferol. 2S er forkortelse for alle isomerene som har S konfigurasjon i 2. posisjon (SSS, SRR, SRS, SRR).

Tilsynelatende gjenfinningsgrad er et mål på hvor mye av α -tokoferol tilført i fôret som ble gjenfunnet i melka (beregnet ved Formel 1). Gjenfinningsgraden er tilsynelatende, fordi det er mulig at noe av α -tokoferol i melka stammer fra lager av vitamin E i fett- og leverceller, selv om disse lagrene er begrensede. Det er dermed ikke mulig å vite sikkert om alt α -tokoferol som blir funnet i melk stammer fra fôret. Tilsynelatende gjenfinningsgrad vil heretter bli referert til som gjenfinningsgrad.

Gjenfinningsgrad av α -tokoferol i melk er vist i Tabell 23. Blanding med tangmel og kontrollblandingen gav større gjenfinningsgrad enn blandingene med tilsatt vitamin E i form av syntetisk- eller naturlig vitamin E.

Tabell 23: Gjenfinningsgrad (%) av α -tokoferol i melk.

	----- Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E -----					
	Tangmel	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E	Kontroll	SE ¹	P-verdi
Total	3,15 ^a	1,92 ^b	2,02 ^b	2,86 ^a	0,152	<0,0001
RRR ²	3,14 ^a	2,78 ^b	2,09 ^c	2,90 ^{ab}	0,165	<0,0001
2R ³	3,14 ^a	2,45 ^b	2,08 ^c	2,89 ^a	0,160	<0,0001

Ulike bokstaver i hevet skrift viser signifikant forskjell mellom forsøksblandingene.

¹ SE = standardfeil

² RRR = RRR- α -tokoferol

³ 2R = alle α -tokoferolisomerene som har R-konfigurasjon i 2. posisjon (RRR, RSR, RRS, RSS).

3.2.6 Biotilgjengelighet

Forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom rasjon med naturlig- og rasjon med syntetisk vitamin E i plasma og melk er beregnet ved Formel 2 (kapittel 3.1.9). Økning i forhold til kontroll og tangmel er beregnet ved Formel 3 (kapittel 3.1.9) og beskriver forskjellen i biotilgjengelighet som skyldes forsøksblandingene fordi det er korrigert for innhold av vitamin E i grunnfôr og surfôr. Resultatene er vist i Tabell 24. Årsaken til at vi kan bruke økning i forhold til tangmel er det lave innholdet av α -tokoferol i tangmelblandingen (se Tabell 17). Økning i forhold til kontroll gir veldig stor forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom naturlig- og syntetisk vitamin E i plasma sammenlignet med de andre forholdstallene som er beregnet. Både økning i forhold til kontroll og økning i forhold til tangmel gav større forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom naturlig- og syntetisk vitamin E i melk, enn i plasma.

Tabell 24: Forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom rasjon med naturlig- og rasjon med syntetisk vitamin E.

	--Forsøksblanding med tilskudd av vitamin E--				Forhold: naturlig vit. E/syntetisk vit. E	
	Tangmel	Syntetisk vit. E	Naturlig vit. E	Kontroll	Korrigert for opptak	
<i>Melk</i>						
α -tokoferol mg/L	1,14	1,25	1,50	1,20	1,2	1,1
Økning i forhold til kontroll		0,05	0,30		6	4,7
Økning i forhold til tangmel		0,11	0,36		3,3	2,6
<i>Plasma</i>						
α -tokoferol mg/L	10,13	11,27	13,17	9,99	1,2	1,1
Økning i forhold til kontroll		1,28	3,18		2,5	1,9
Økning i forhold til tangmel		1,14	3,04		2,7	2,1

Relativ biotilgjengelighet av de enkelte stereoisomerene av α -tokoferol og forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom all-rac- og RRR- α -tokoferol etter tilførsel av blanding med syntetisk vitamin E er vist i tabell 25. Resultatene i Tabell 25 er beregnet ved Formel 4, 5, 6, 7, 8, 9 og 10 (kapittel 3.1.9, Beregninger). Sammenlignet med RRR- α -tokoferol er de andre 2R-isomerene omtrent halvparten så tilgjengelige, mens 2S-isomerene viser en mye lavere biotilgjengelighet. Forholdstallet for forskjellen i biotilgjengelighet etter tilførsel av syntetisk vitamin E var 2,9:1 og 3,1:1 i henholdsvis plasma og melk.

Tabell 25: Relativ biotilgjengelighet av de enkelte stereoisomerene av α -tokoferol etter tilskudd av syntetisk vitamin E (forsøksblanding 2) og forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom all-rac- og RRR- α -tokoferol.

Fordeling %	RRR ^a	RRS ^a	RSR ^a	RSS ^a	2S ^a	Relativ biotilgjengelighet av RRR ^a /all-	
						all-rac ^b i forhold til RRR ^a .	rac ^b
Fôr	61,2	5,6	5,4	5,6	22,7		
Plasma	86,6	4,8	3,6	4,1	1		
Plasma/fôr	1,41	0,86	0,66	0,74	0,04		
Relativ til RRR ^a	100	61	47	52	3	34	2,9
Melk	87,4	3,9	3,8	3,4	1,5		
Melk/fôr	1,43	0,70	0,70	0,61	0,07		
Relativ til RRR ^a	100	49	49	43	5	32	3,1

^a Forkortelsene beskriver stereokjemisk struktur av α -tokoferol og forteller hvilken konfigurasjon det er i de tre kirale senterne, henholdsvis i posisjon 2, 4 og 8. Alle forkortelsene har endelse – α -tokoferol. 2S er forkortelse for alle isomerene som har S konfigurasjon i 2. posisjon (SSS, SRR, SRS, SRR).

^b all-rac = all-rac- α -tokoferol.

Relativ biotilgjengelighet av de enkelte stereoisomerene av α -tokoferol og forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom all-rac- og RRR- α -tokoferol etter tilskudd av naturlig vitamin E, er vist i tabell 26 (beregnet på samme måte som Tabell 25). Biotilgjengeligheten av RSR- og RSS- α -tokoferol relativt til RRR- α -tokoferol var mye større ved tilskudd av naturlig vitamin E enn ved tilskudd av syntetisk vitamin E (Tabell 25). Likevel gir tilskudd av naturlig vitamin E større relativ biotilgjengelighet av RRR- α -tokoferol enn all-rac- α -tokoferol på grunn av at 2S-isomerene hadde en svært lav biotilgjengelighet relativt til RRR- α -tokoferol.

Tabell 26: Relativ biotilgjengelighet av de enkelte stereoisomerene av α -tokoferol etter tilskudd av naturlig vitamin E (forsøksblanding 3) og forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom all-rac- og RRR- α -tokoferol.

<i>Fordeling %</i>	RRR ^a	RRS ^a	RSR ^a	RSS ^a	2S ^a	Relativ biotilgjengelighet av RRR ^a /all-	
						all-rac ^b i forhold til RRR ^a .	rac ^b
Fôr	94,8	1,9	0,3	0,2	2,8		
Plasma	97,4	1,1	0,6	0,8	0,1		
Plasma/fôr	1,03	0,58	2,09	3,35	0,04		
Relativ til RRR ^a	100	56	204	326	3	87	1,1
Melk	97,9	0,7	0,7	0,4	0,3		
Melk/fôr	1,03	0,37	2,44	1,67	0,11		
Relativ til RRR ^a	100	35	236	162	10	72	1,4

^a Forkortelsene beskriver stereokjemisk struktur av α -tokoferol og forteller hvilken konfigurasjon det er i de tre kirale senterne, henholdsvis i posisjon 2, 4 og 8. Alle forkortelsene har endelse – α -tokoferol. 2S er forkortelse for alle isomerene som har S konfigurasjon i 2. posisjon (SSS, SRR, SRS, SRR).

^b all-rac = all-rac- α -tokoferol.

3.3 Diskusjon

3.3.1 Innhold av α -tokoferol i fôret

Surfôret som ble brukt i dette forsøket hadde et litt høyere innhold av α -tokoferol enn det Mogensen et al. (2012) fant i sine undersøkelser av fortørket surfôr fra økologisk gårdsbruk i Danmark. Sammenlignet med Lindqvist et al. (2011a) som undersøkte ulike arter og ensileringsmetoder hadde surfôret i vårt forsøk middels innhold av α -tokoferol. Som forventet hadde grunnfôret et lavt innhold av α -tokoferol på grunn av det høye innholdet av havre (75,9 %). Det var ikke mulig å bestemme fordelingen av de ulike stereoisomerene i grunnfôret fordi konsentrasjonen av α -tokoferol i prøven var for lav. Ettersom grunnfôret ikke var tilsatt syntetisk vitamin E kan vi gå ut i fra at α -tokoferol i grunnfôret var 100 % RRR- α -tokoferol.

Alle forsøksblandingene hadde et lavere innhold av α -tokoferol enn forventet (Tabell 18). Innholdet av α -tokoferol i tangmelblanding ble redusert med 73 % etter pelletering. Blanding med naturlig- og syntetisk vitamin E ble redusert med henholdsvis 61 og 69 %. Den kraftige reduksjonen i α -tokoferolinnhold etter pelletering tyder på at pelleteringsprosessen har hatt stor virkning på α -tokoferolinnholdet i forsøksblandingene. Rapporter fra fôrprodusenten viste at det oppstod en blokkering av pelletpressa under produksjonen av forsøksblanding 1 (med tangmel). Produsenten tror at dette skyldes at sammensetningen av fôrblandingene gav en konsistens som førte til at massen ikke kom seg gjennom pelletpressa (Pers. med.: Miladinovic, D.D., 25.03.12). Ved produksjon av forsøksblanding 2, 3 og 4 ble temperatur og tilsetning av damp redusert i forhold til ved produksjon av forsøksblanding 1. Likevel var temperaturen i den ferdig pelleterte massen 100,5 °C (Pers. med.: Miladinovic, D.D., 25.03.12). Det er sannsynlig at konsistensen til massen har skapt stor friksjon i pelletpressa og dermed en høy temperatur. Vitamin E er ustabil under forhold som fremmer oksidering, som for eksempel høy temperatur (McDowell 1988). Det er mulig at den høye temperaturen kan ha ødelagt α -tokoferol i fôret.

α -tokoferol, som ble tilsatt i blandingene med naturlig- og syntetisk vitamin E, var bundet til acetat (esterifisert). Som nevnt, blir dette gjort for å øke stabiliteten av vitaminet under prosessering (McDowell 1988). EFSA (2010) fant imidlertid ingen forskjell i stabilitet mellom esterifisert og uesterifisert α -tokoferol. Blandingen med tangmel hadde et prosentvis større tap av α -tokoferol enn blanding med naturlig- og syntetisk vitamin E. Om dette skyldes at blandingen

med tangmel inneholdt uesterifisert α - tokoferol, mens blandingene med naturlig og syntetisk vitamin E hadde esterifisert α - tokoferol er ikke mulig å påvise.

Distribusjonen av de ulike stereoisomerene i forsøksblandingene var heller ikke som forventet. Tilsetningsproduktene hadde forventet stereoisomerfordeling, med 100 % RRR- α - tokoferol i tangmelproduktet og produktet med naturlig vitamin E, samt ca. 12,5 % av hver stereoisomer i det syntetiske produktet (Tabell 19). Etter blanding av de ulike forsøksblandingene viste stereoisomerfordelingen at alle forsøksblandingene hadde et betydelig innhold av syntetiske stereoisomerer før pelletering (Tabell 19). Alle blandingene, bortsett fra tangmelblanding, skulle tilsettes en mineralblanding for å sikre tilførsel av essensielle mineraler. Planlagt sammensetning av mineralblandingen er vist i Tabell 8. Etter nærmere undersøkelser viste det seg at mineralblandingen ikke hadde blitt tilsatt, men at det i stedet ble brukt en vitamin/mineralpremik som inneholdt 3000 mg syntetisk vitamin E. Dette forklarer den uventede fordelingen i blanding med naturlig vitamin E og kontrollblanding, og det relativt høye innholdet av α - tokoferol i kontrollblandingen.

Blandingen med tangmel var den første som ble laget hos fôrprodusenten. Anlegget ble i følge fôrprodusenten rensert før og etter blanding av hver forsøksblanding (Pers. med.: Miladinovic, D.D., 25.03.12). Det er derfor lite sannsynlig at blandingen med tangmel ble kontaminert med syntetisk vitamin E under produksjonen. I og med at andelen syntetiske stereoisomerer i denne blandingen var såpass stor (Tabell 17) må det ha blitt tilsatt en betydelig mengde syntetisk vitamin E. Det er vanskelig å forklare hva som har skjedd og eventuelle forklaringer vil bare være spekulasjoner siden vi ikke har grunnlag for å påstå at noen av komponentene tilsatt i blandingen inneholdt syntetisk vitamin E.

3.3.2 Fôropptak

I Tabell 27 er surfôret sammenlignet med kriterier brukt for kvalitetsbedømmelse av surfôr fra Eurofins AS (2010). Surfôret har i hovedsak god gjæringskvalitet, men innhold av eddiksyre er litt lavt og ammoniakkinholdet litt høyt sammenlignet med kriteriene fra Eurofins AS (Eurofins 2010). Selv med et tørrstoffinnhold på 28,7 % er pH på 4,4 litt høyt.

Tabell 27: Gjæringskvalitet av surfôret sammenlignet med kriterier for bedømmelse av surfôr kvalitet fra Eurofins AS (Eurofins 2010).

	g/ kg TS ¹						g/kg N ¹		pH
	Melkesyre	Eddiksyre	Smørtsyre	Maursyre	Propionsyre	Sum syrer	Etanol	Ammoniakk	
Surfôr	45,5	5,4	1,0	9,0	0,0	60,9	5,7	53,0	4,4
Eurofins	40-80	12-30	< 4	> 8	< 2	< 100	< 8	30-40g	< 4,2

¹ TS = tørrstoff.

² N = nitrogen.

På grunn av god surfôr kvalitet var det høyt surfôropptak gjennom hele forsøksperioden. Forskjellene i opptak av grunnfôr og forsøksblandingene (Tabell 20) er vanskelig å forklare, men dersom det var dårlig smak av de rene vitamin E produktene som ble tilsatt kan dette være en mulig årsak. Siden deler av grunnfôret ble tildelt sammen med forsøksblandingene kan dårlig smak også ha påvirket opptaket av grunnfôr.

Noen av forsøksdyrene vraket relativt store mengder grunnfôr og forsøksfôr, og mengden rester økte utover i forsøket. Forsøksdyrene var ca. 150 dager ut laktasjonen ved forsøksstart. Melkemengden gikk derfor betydelig ned utover i forsøksperioden, og dermed også behovet for energi. Siden mengden grunnfôr og forsøksfôr var konstant gjennom hele forsøket, for å tilføre like mengder α -tokoferol, førte det til en økning i hold og vekt utover i forsøket. Ettersom grovfôret hadde bra kvalitet holdt grovfôropptaket seg høyt gjennom hele forsøket, noe som sannsynligvis er årsaken til den økende mengden rester av grunnfôret og forsøksblandingene.

3.3.3 α -tokoferol i plasma og melk

Innholdet av α -tokoferol i plasma varierer med laktasjonsstadium (Sjöberg 2005).

Plasmakonsentrasjonen av α -tokoferol målt av Meglia et al. (2006) på kyr rett før og rett etter kalving varierte fra ca. 2-4 mg/l. Lindqvist et al (2011b) utførte forsøk der plasmakonsentrasjon av α -tokoferol ble målt 3 uker før kalving, ved kalving, 3 uker etter kalving og 5-7 måneder etter kalving. Forsøket viste lavest konsentrasjon av α -tokoferol i plasma ved kalving, og høyest konsentrasjon 5-7 måneder etter kalving, med ca. 6,8 til 7,5 mg/l (Lindqvist et al. 2011b).

Sammenlignet med disse forsøkene var det høy plasmakonsentrasjon av α -tokoferol i vårt forsøk (Tabell 21). Dette kan skyldes at kyrne var i midt- og seinlaktasjon i forsøksperioden og at plasmakonsentrasjonen av α -tokoferol øker utover i laktasjonen. Likevel var plasmakonsentrasjonen av α -tokoferol også høyere enn hva som ble vist i forsøk av Jensen et al. (2005), som også var målt på dyr i midtlaktasjon. Det er ikke grunnlag til å forklare de høye nivåene i vårt forsøk.

Tilførsel av blanding med tangmel og blanding med syntetisk vitamin E førte til et signifikant lavere innhold av fett i melka. Årsaken til dette er ikke undersøkt, men selv om det var signifikant forskjell i fettinnhold i melka mellom blandingen med tangmel og kontrollblandingen, var det ikke signifikant forskjell mellom disse i innhold av α -tokoferol i mg/kg melkefett eller i mg/l melk (Tabell 21). Dette diskuteres derfor ikke videre her.

Konsentrasjonen av α -tokoferol i melk var høyere hos dyr som fikk mer α -tokoferol i rasjonen. Dette styrker tidligere studier som viser at det er mulig å øke innholdet av α -tokoferol i melk ved å øke tilførselen gjennom fôret (Mogensen et al. 2010). Som tidligere nevnt foreslo Yeargan et al. (1979) at det finnes en maksimumsgrense for økning av α -tokoferol i melk opptil 45 mg/kg melkefett. I vårt forsøk var det et innhold av α -tokoferol på 27,6 - 35,3 mg/kg melkefett. Derfor kunne det vært mulig å øke innholdet av α -tokoferol i melken ytterligere ved å tilføre mer α -tokoferol i fôret.

Gjenfinningsgrad i melk (Tabell 23) viser at en tilsynelatende større andel α -tokoferol tilført med fôret ble gjenfunnet i melk ved tilskudd av blanding med tangmel og kontrollblanding sammenlignet med blanding med naturlig og blanding med syntetisk vitamin E. Dette er vanskelig å forklare ettersom maksimumsgrensen for innhold av α -tokoferol i melk ikke er nådd.

Det er mulig at noe av vitamin E i melka stammer fra lager i kroppen og dette kan ha påvirket gjenfinningsgraden.

3.3.4 Biotilgjengelighet

Siden midten av 1900-tallet har det blitt forsket på forskjellen i biotilgjengelighet mellom naturlig- og syntetisk vitamin E. Likevel var det ikke før forsøkene til Jensen & Lauridsen (2003), Jensen et al.(2005) og Meglia et al. (2006) at de første resultatene for stereoisomerfordeling i plasma og vev hos drøvtyggere ble publisert. Formålet med vårt forsøk var å undersøke biotilgjengelighet av α - tokoferol i tangmel sammenlignet med naturlig- og syntetisk vitamin E. På grunn av det lave innholdet av α - tokoferol i tangmelblandingen som ble brukt i forsøket, kan vi dessverre ikke bestemme biotilgjengeligheten av α - tokoferol i tangmel. Våre resultater er likevel interessante fordi det foreligger lite resultater for biotilgjengeligheten av naturlig- og syntetisk vitamin E på kyr i midt- og seinlaktasjon.

Biotilgjengelighet av α - tokoferol er et mål på hvor mye av α - tokoferol som blir absorbert og gjort tilgjengelig for transport og metabolisme i dyret (Bramley et al. 2000). Siden α - tokoferol er et fettløselig molekyl kan det ikke måles biotilgjengelighet ved intravenøs tilførsel (Jensen & Lauridsen 2007). Derfor brukes uttrykket relativ biotilgjengelighet, som normalt uttrykkes ved økning av konsentrasjon i plasma eller vev etter oral tilførsel (Dersjant-Li & Peisker 2010). I dette forsøket ble det ikke tatt ut prøver for å finne innholdet av α - tokoferol i plasma eller melk før oral tilførsel fordi formålet var å sammenligne de ulike behandlingene. Derfor uttrykkes relativ biotilgjengelighet i Tabell 24 som forholdet mellom de ulike behandlingene.

Tabell 28 viser en sammenligning av våre resultater for relativ biotilgjengelighet mellom rasjon med naturlig- og syntetisk vitamin E med beregninger utført av Dersjant-Li & Peisker (2010) på resultater fra en studie av Weiss et al. (2009). Vårt forsøk viste mindre forskjell i relativ biotilgjengelighet enn forsøket til Weiss et al. (2009). Årsaken kan være at kyrne i vårt forsøk var i midt- og seinlaktasjon, mens i forsøket til Weiss et al. (2009) var målingene utført på kyr fra 14 dager før kalving til 14 dager etter kalving, som førte til at kyrne i forsøket til Weiss et al. (2009) hadde større behov for vitamin E.

Tabell 28: Sammenligning av vårt forsøk med forsøk utført av Weiss et al. (2009) med hensyn på forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom rasjoner med naturlig- og syntetisk vitamin E.

Studie	Forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom rasjon med naturlig- og syntetisk vitamin E
Vårt forsøk (Tabell 24)	1,2:1
Weiss et al. (2009) ^a	2,2:1 ^b

^aUtført på kyr føret med 2500 IE/d av RRR- α -tokoferylacetat, 2500 IE/d av all-rac- α -tokoferylacetat eller ingen tilskudd av vitamin E (Weiss et al. 2009).

^bForholdstallet er beregnet av Dersjant-Li & Peisker (2010)

Denne studien viser at RRR- α -tokoferol er den dominerende stereoisomeren av α -tokoferol i plasma og melk hos kyr i midt- og seinlaktasjon uavhengig av vitamin E kilde (Tabell 21). Relativ biotilgjengelighet på rasjonsbasis (Tabell 24) viser som forventet, at høyere innhold av RRR- α -tokoferol i rasjonen (Tabell 20) gir høyere biotilgjengelighet av rasjonen. Ettersom det var store avvik i sammensetningen av rasjonene i forhold til det som var planlagt er det mest interessant å studere biotilgjengeligheten av de enkelte stereoisomerene (Tabell 25 og Tabell 26).

Beregninger tilsvarende de som er gjort for våre resultater, utført av Dersjant-Li & Peisker (2010), basert på resultater av Jensen & Lauridsen (2003) viste et forhold mellom RRR- α -tokoferol og all-rac- α -tokoferol på 6,7:1 og 4,7:1 i henholdsvis plasma og melk. Dette er betydelig høyere enn det vi fant i vårt forsøk (Tabell 25). Laktasjonsstadium og bidrag av α -tokoferol fra basaldiett var ikke oppgitt i artikkelen av Jensen & Lauridsen (2003) og det er derfor vanskelig å forklare hvorfor de fikk en større forskjell i biotilgjengelighet enn vi fikk i vårt forsøk. Tidligere studier har vist sprikende resultater for forskjellen i biotilgjengelighet mellom RRR- og all-rac- α -tokoferol (Jensen & Lauridsen 2007). Lodge (2005) studerte forskjellen i biotilgjengelighet på mennesker og fant et forholdstall i nærheten av det som er generelt akseptert på 1,36:1. Dersjant-Li & Peisker (2010) sammenstilte en rekke forsøk som har målt innhold av α -tokoferol i plasma og melk på melkekyr, og viste at forskjellen i biotilgjengelighet mellom RRR- og all-rac- α -tokoferol varierte fra 2,2:1 til 3,8:1. Forsøk utført på melkekyr like før og like etter kalving indikerer at forskjellen i biotilgjengelighet mellom RRR- α -tokoferol og de syntetiske stereoisomerene er betydelig høyere enn det som er generelt akseptert i dag (Meglia et al. 2006). Resultatene fra denne studien styrker dette og viser at det også gjelder for dyr i midt- og seinlaktasjon.

Resultatene for relativ biotilgjengelighet mellom de enkelte stereoisomerene (Tabell 25 og Tabell 26) indikerer at det ikke er noen konstant biotilgjengelighet for de enkelte stereoisomerene, men at opptak i plasma og melk varierer med ulike stereoisomer distribusjon. Det er også forskjell i relativ biotilgjengelighet mellom plasma og melk (Tabell 25 og Tabell 26). Blatt et al. (2004) påpeker også at biotilgjengeligheten ikke er konstant og begrunner dette med at relativ konsentrasjon av all-rac- og RRR- α -tokoferol varierer mellom ulike vev, med tilført mengde og tid etter tilførsel.

Biotilgjengelighet av de enkelte stereoisomerene relativt til RRR- α -tokoferol (Tabell 25) viser at isomerene som har R-konfigurasjon i posisjon 2 er svært mye mer tilgjengelige enn de som har S-konfigurasjon i posisjon 2. Dette var forventet da konfigurasjonen i 2. posisjon har større betydning for den romlige strukturen til molekylet enn konfigurasjonen i 4. eller 8. posisjon. Det er fordi konfigurasjonen i 2. posisjon har stor innvirkning på posisjonen til kromanolringen (Pers. med.: Jensen, S.K., 17.01.12). Tabell 26 viser at RSR- og RSS- α -tokoferol har høyere biotilgjengelighet relativt til RRR- α -tokoferol ved rasjon med tilskudd av naturlig vitamin E. Dette skyldes trolig at andelen RSR- og RSS- α -tokoferol i denne rasjonen var svært lav, med henholdsvis 0,3 og 0,2 mg/kg TS. Likevel var den relative biotilgjengeligheten av 2S-isomerene fremdeles lav. Dette forsterker indikasjonen på at 2S-isomerene har svært lav biotilgjengelighet i forhold til 2R-isomerene.

3.3.5 Tilskudd av vitamin E i økologisk melkeproduksjon.

Rasjonene i dette forsøket tilførte langt mer vitamin E enn anbefalingene fra NRC (2001) på 0,8 IE/kg kroppsvekt per dag for en lakterende ku (Tabell 20). Grovfôret alene tilførte i gjennomsnitt 575 mg α -tokoferol. Dette tilsvarer 858 IE, dersom vi regner med at én internasjonal enhet er lik 0,67 mg RRR- α -tokoferol, som fastsatt av EFSA (2010). Dette gir 1,56 IE/kg kroppsvekt per dag for ei ku på 550 kg, noe som er langt høyere enn anbefalingene fra NRC. Dette tyder på at grovfôr med tilsvarende innhold av α -tokoferol dekker behovet for vitamin E til kyr i midt- og seinlaktasjon, og tilskudd vil derfor ikke være nødvendig dersom opptaket av grovfôr er høyt, slik som i dette forsøket. Samme konklusjon gjorde Sjöberg (2005) etter sitt forsøk for å undersøke forsyning av vitamin E i økologisk melkeproduksjon i Sverige. Stor variasjon i innhold av α -tokoferol i surfôr gjør det vanskelig å forutsi om surfôret vil dekke behovet for vitamin E til melkekyr, uten å utføre analyser.

Dette forsøket gir som nevnt ikke grunnlag for å fastsette biotilgjengeligheten av α -tokoferol i tangmel. Likevel, siden tangmel kun inneholder den naturlige stereoisomeren av α -tokoferol (RRR- α -tokoferol), er det sannsynlig at biotilgjengeligheten vil være den samme som for RRR- α -tokoferol fra andre kilder. Som nevnt, kan høy temperatur være en mulig årsak til den kraftige reduksjonen av α -tokoferol i blandingen med tangmel. Metode for prosessering kan derfor påvirke det kvantitative innholdet av α -tokoferol i tangmel. Dersom innholdet av α -tokoferol opprettholdes gjennom prosesseringen kan tilskudd av tangmel bidra med noe vitamin E, men om tangmel er egnet som tilskuddsfôr i økologisk melkeproduksjon vil avhenge av det kvantitative behovet til melkekyrne.

Dersom vi regner tangmel som eneste kilde til vitamin E i rasjonen, må det tilføres ca. 3,5 kg tangmel (ca. 3 kg tørrstoff) per dag for å dekke anbefalingene fra NRC (2001). Dette gjelder dersom vi går ut i fra at tangmel har et innhold av α -tokoferol på 90 mg/kg TS og at én internasjonal enhet tilsvarer 0,67 mg RRR- α -tokoferol. Ved tilførsel av så store mengder tangmel vil fôropptaket av andre fôrmidler gå ned. Det kan føre til lavere energitilførsel til kua, ettersom tangmel inneholder relativt lite energi (Tabell 15). Lavere energitilførsel vil redusere melkemengden og dermed lønnsomheten i produksjonen. Tangmel vil derfor ikke være egnet som tilskuddsfôr til melkekyr med stort behov for vitamin E, dersom tangmel regnes som eneste kilde til vitamin E i rasjonen. Tangmel har et høyt innhold av aske og et særlig høyt innhold av jod (Breirem & Homb 1970; Jensen et al. 1968). Tilførsel av store mengder tangmel kan derfor ha andre uheldige konsekvenser, som jodforgiftning, uten at det skal diskuteres videre her.

Ettersom tangmel ikke er godt egnet som tilskuddsfôr til melkekyr med stort behov for vitamin E vil det være hensiktsmessig å prøve å finne andre kilder til naturlig vitamin E som kan brukes i melkeproduksjonen. Bruk av naturlig vitamin E vil kunne bidra til å redusere forbruket av tilskuddsfôr siden naturlig vitamin E er mer biotilgjengelig enn syntetisk vitamin E. For økologisk melkeproduksjon vil det være særlig positivt å bruke naturlig vitamin E ettersom det er et mål om å bruke minst mulig syntetiske tilsetningsstoffer. Bruk av naturlig vitamin E ekstrahert fra planteoljer kan være et alternativ til å bruke syntetisk vitamin E. Likevel bør det undersøkes hvor ressurskrevende denne produksjonen er, for å sikre at det er forenelig med prinsippene i økologisk produksjon. Produksjonsmetodene for ekstrahering av naturlig vitamin E fra planteoljer ble ikke undersøkt i denne oppgaven.

3.4 Konklusjon

På grunn av lavt innhold av vitamin E i forsøksblandingen med tangmel kan vi ikke fastsette biotilgjengelighet av vitamin E i tangmel ut fra dette forsøket. Innholdet av vitamin E i tangmel varierer og vil være en upålitelig kilde til vitamin E for melkekyr i likhet med grovfôr.

I melkeproduksjonen bør det nyttes tilskudd av vitamin E for å være sikker på å dekke dyras behov, siden innholdet i grovfôr er svært variabelt. Naturlig vitamin E er betydelig mer biotilgjengelig enn syntetisk vitamin E og bruk av naturlig vitamin E som tilskuddsfôr vil derfor føre til et kvantitativt lavere behov for tilskudd av dette vitaminet. For økologisk melkeproduksjon vil det være en fordel å bruke vitamin E fra en naturlig kilde, ettersom det er et mål i økologisk melkeproduksjon å bruke minst mulig syntetiske tilsetningsstoffer. Dersom det ikke er mulig å finne en naturlig kilde til vitamin E som tilfredsstiller kravene innen økologisk produksjon bør det fortsatt være tillatt å bruke syntetisk vitamin E som tilskuddsfôr for å sikre dyrehelse og bedre produktkvaliteten.

4.0 Litteraturliste

- Alderson, N. E., Mitchell, G. E., Little, C. O., Warner, R. E. & Tucker, R. E. (1971). Preintestinal disappearance of vitamin E in ruminants. *Journal of Animal Nutrition*, 101: 655-659.
- Allen, V. G., Pond, K. R., Saker, K. E., Fontenot, J. P., Bagley, C. P., Ivy, R. L., Evans, R. R., Schmidt, R. E., Fike, J. H., Zhang, X., et al. (2001). Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidants in forages and livestock - A review. *Journal of Animal Science*, 79: 21-31.
- ARC, (1980). Agricultural Research Council. *The nutrient requirements of ruminant livestock: technical review*. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux. 351 s.
- Bernhoft, A., Høie, R., Randby, Å. T. & Bræve, L. (2002). Lavt innhold av vitamin E i rundballesurfôr. *Husdyrforsøksmøtet 2002*, Inst. for husdyrfag. NLH: 209-212.
- Blatt, D. H., Pryor, W. A., Mata, J. E. & Rodriguez-Proteau, R. (2004). Re-evaluation of the relative potency of synthetic and natural α -tocopherol: experimental and clinical observations. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15 (7): 380-395.
- Blood, D. C. & Studdert, V. P. (1999). *Saunders comprehensive veterinary dictionary*. London: Saunders. 1380 s.
- Bramley, P. M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F. J., Manios, Y., Roxborough, H. E., Schuch, W., Sheehy, P. J. A. & Wagner, K. H. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7): 913-938.
- Breirem, K. & Homb, T. (1970). *Fôrmidler og fôrkonservering*: Forlag buskap og avdrått AS. 459 s.
- Brigelius-Flohé, R. (2009). Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. *Free Radical Biology and Medicine*, 46 (5): 543-554.
- Brown, F. (1953). The tocopherol content of farm feeding-stuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 4 (4): 161-165.
- Danielsson H., Nadeau E., Gustavsson A.M., Jensen S.K., Soegaard K. & Nilsson-Linde N. (2008). Contents of alpha-tocopherol and beta-caroten in grasses and legumes harvested at different maturities. *Grassland Science in Europe*, 13: 432-434.

- Dersjant-Li, Y. & Peisker, M. (2010). A critical review of methodologies used in determination of relative bio-availability ratio of RRR- α -tocopheryl acetate and all-rac- α -tocopheryl acetate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 1571-1577.
- EFSA. (2010). European Food Safety Authority. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. Scientific Opinion on the safety and efficacy of vitamin E as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal*, 8 (6): 1635.
- Engstrand, U. & Olsson, U. (2003). *Variansanalys och försöksplanering*. Lund: Studentlitteratur. 304 s.
- Eurofins. (2010). *Forklaring til analysebeviset - Grovfôr*. Tilgjengelig fra: <http://www.eurofins.no/media/1575972/Grovfor-forklaring-analyser280510.pdf>.
- Eurofins. (2012). www.eurofins.no. Tilgjengelig fra: <http://www.eurofins.no/kontakt-oss-/kontakt-mat-og-landbruk/landbruk.aspx>.
- Gillund, P., Karlberg, K., Reksten, O. & Lutnæs, B. (2000). Forenklet metode for holdvurdering av melkekyr. *Husdyrforsøksmøtet 2000*, Geno - avl og semin, Institutt for reproduksjon og rettsmedisin, NVH og TINE Østlandmeieriet.
- Harris, P. L. & Ludwig, M. I. (1949). Relative vitamin E potency of natural and synthetic alpha-tocopherol. *The Journal of Biological Chemistry*, 179: 1111-1115.
- Hart, H., Hart, D. J. & Craine, L. E. (1995). *Organic chemistry: a short course*. Geneva, Ill.: Houghton Mifflin Co. 572 s.
- Herd, T. H. & Stowe, H. D. (1991). Fat-soluble vitamin nutrition for Dairy-cattle. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 7 (2): 391-415.
- Hogan, J. S., Weiss, W. P. & Smith, K. L. (1993). Role of Vitamin E and Selenium in Host Defense Against Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 76 (9): 2795-2803.
- Hymøller, L. & Jensen, S. K. (2010). Stability in the rumen and effect on plasma status of single oral doses of vitamin D and vitamin E in high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93 (12): 5748-5757.
- Jensen, A., Nebb, H. & Sæter, E. A. (1968). The value of Norwegian Seaweed Meal as a Mineral Supplement for Dairy Cows. *Norsk institutt for tang- og tareforskning*, Report no. 32.
- Jensen, A. (1969). Tocopherol content of seaweed and seaweed meal: I.—Analytical methods and distribution of tocopherols in benthic algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20 (8): 449-453.

-
- Jensen, S. K., Engberg, R. M. & Hedemann, M. S. (1999). All-rac-alpha-Tocopherol Acetate Is a Better Vitamin E Source than all-rac-alpha-Tocopherol Succinate for Broilers. *The Journal of Nutrition*, 129 (7): 1355-1360.
- Jensen, S. K., Johannsen, A. K. B. & Hermansen, J. E. (1999). Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol, b-carotene and a-tocopherol into cows' milk. *Journal of Dairy Research*, 66: 511-522.
- Jensen, S. K. & Lauridsen, C. (2003). *Relative proportion of stereoisomers of alpha-tocopherol in fluids and tissues from rats, pigs, cows and poultry explains different bioactivity of dietary natural and synthetic vitamin E between different animal species*. 9th Symposium: Vitamins and additives in nutrition of man and animal. September 24th and 25th, 2003. Jena/Thuringia, Germany, s. 136-141.
- Jensen, S. K., Kristensen, N. B., Lauridsen, C. & Sejrsen, K. (2005). *Enrichment of cow's milk with natural or synthetic vitamin E*. 10th Symposium: Vitamins and additives in nutrition of man and animal, 28-29 September, 2005. Jena/Thuringia, Germany, s. 78-83.
- Jensen, S. K. & Lauridsen, C. (2007). alpha-Tocopherol stereoisomers. I: Litwack, G. (red.) *Vitamins and Hormones*, b. 76 *Vitamin E: Vitamins and Hormones Advances in Research and Applications*, s. 281-308. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Lindqvist, H., Nadeau, E. & Jensen, S. K. (2011a). Alpha-tocopherol and β -carotene in legume-grass mixtures as influenced by wilting, ensiling and type of silage additive. *Grass and Forage Science*, 67: 119-128.
- Lindqvist, H., Nadeau, E., Persson Waller, K., Jensen, S. K. & Johansson, B. (2011b). Effects of RRR- α -tocopheryl acetate supplementation during the transition period on vitamin status in blood and milk of organic dairy cows during lactation. *Livestock Science*, 142 (1-3): 155-163.
- Lindqvist, H. (2012). *Alpha-Tocopherol and beta-Carotene i Forages and their Utilisation by Dairy Cows in Organic Production*. Skara: Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Environment and Health.
- Lodge, J. K. (2005). Vitamin E bioavailability in humans. *Journal of Plant Physiology*, 162 (7): 790-796.
-

- Lynch, M. & Walsh, B. (1998). Variance-Component Estimation with Complex Pedigrees. I: *Genetics and analysis of quantitative traits*, s. 779-803. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Mattilsynet. (2005a). *Veileder til forskrift om økologisk produksjon og merking av økologiske landbruksprodukter og næringsmidler, av 4. oktober 2005. Veileder A. Felles veileder for produksjon, foredling, lagring, import og omsetning av økologiske landbruksprodukter, næringsmidler og fôrvarer*. 1103. Tilgjengelig fra: http://www.debio.no/_upl/veileder_a.pdf.
- Mattilsynet. (2005b). *Veileder til forskrift om økologisk produksjon og merking av økologiske landbruksprodukter og næringsmidler, av 4. oktober 2005. Veileder B. Utfyllende informasjon om økologisk landbruksproduksjon*. 1103. Tilgjengelig fra: http://www.debio.no/_upl/veileder_b.pdf.
- McDonald, P. (2002). *Animal nutrition*. Harlow: Prentice-Hall. 693 s.
- McDowell, L. R. (1988). *Vitamins in animal nutrition: comparative aspects to human nutrition*. San Diego, Calif.: Academic Press. 486 s.
- McDowell, L. R. (2003). *Minerals in animal and human nutrition*. Amsterdam: Elsevier. 644 s.
- Meglia, G. E., Jensen, S. K., Lauridsen, C. & Persson Waller, K. (2006). α -Tocopherol concentration and stereoisomer composition in plasma and milk from dairy cows fed natural or synthetic vitamin E around calving. *Journal of Dairy Research*, 73 (02): 227.
- Mogensen, L., Kristensen, T., Jensen, S. K. & Sjøgaard, K. (2010). Flere vitaminer i grovfoderet giver flere vitaminer i mælken. *Nyhedsbrev fra Internationalt Center for Forskning i Økologisk Jordbrug og Fødevarer*.
- Mogensen, L., Kristensen, T., Sjøgaard, K., Jensen, S. K. & Sehested, J. (2012). Alfa-tocopherol and beta-carotene in roughages and milk in organic dairy herds. *Livestock Science*, 145 (1): 44-54.
- Nadeau, E., Johansson, B., Jensen, S. K. & Olsson, G. (2004). Vitamin content of forages as influenced by harvest and ensiling techniques. I: *Grassland Science in Europe Volume 9*, s. 891-893. Zürich: vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zurich.
- Nockels, C. F. (1996). Antioxidants improve cattle immunity following stress. *Animal Feed Science and Technology*, 62 (1): 59-68.

-
- Nordberg, K. (2008). *LabTek - analyser og priser*. Ås: Institutt for husdyr og akvakulturvitenskap. Tilgjengelig fra: <http://www.umb.no/iha/artikkel/labtek-analyser-og-priser>.
- NRC. (1988). National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle*. Washington, D.C.: National Academy Press. 157 s.
- NRC. (2001). National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle*. Washington, D.C.: National Academy Press. 381 s.
- Rigotti, A. (2007). Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, 28 (5-6): 423-436.
- Roginski, H., Fuquay, J. W. & Fox, P. F. (2003). *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic Press. 2799 s.
- SAS. (2009). SAS/STAT 9.2 User's guide, second edition. *SAS Inst., Inc. Car, NC*.
- Sjaastad, Ø. V., Hove, K. & Sand, O. (2010). *Physiology of domestic animals*. Oslo: Scandinavian Veterinary Press. 804 s.
- Sjöberg, S. (2005). *Försörjning av vitamin E hos mjölkkor i ekologisk produktion*. Skara: Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurenes miljø och hälsa. 61 s.
- Søegaard, K., Jensen, S. K. & Sehested, J. (2010). Vitaminer, mineraler og foderværdi af græsmarksarter. Økologisk græsmarksproduktion og udnyttelser til mælkeproduktion. *Internal Report Husbandry, Faculty of Agricultural Sciences, Aarhus University*. 15-20 s.
- Tani, Y. & Tsumura, H. (1989). Screening for Tocopherol-producing Microorganisms and a-Tocopherol Production by *Euglena gracilis* Z. *Agricultural and biological chemistry*, 53 (2): 305-312.
- TINE. (2012). *TINE distriktslaboratoriet Brumunddal: E-post: dbrumund@tine.no*.
- Traber, M. G. & Leonard, S. W. (2001). *The Alpha-tocopherol Transfer Protein and Vitamin E Adequacy*. Tilgjengelig fra: <http://lpi.oregonstate.edu/ss01/attp.html>.
- UMB. (2008). Fôrtabellen. I: *Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap*. Tilgjengelig fra: <http://statisk.umb.no/iha/fortabell/>.
- Vagni, S., Saccone, F., Pinotti, L. & Baldi, A. (2011). Vitamin E bioavailability: past and present insights. *Food and Nutrition Sciences*, 2 (10): 1088 - 1096.
- Weiser, H. & Vecchi, M. (1981). Stereoisomers of alpha-Tocopherol Acetate Characterization of the Samples by Physico-Chemical Methods and Determination og Biological Activities in
-

- the Rat Resorption-Gestation Test. *International journal for vitamin and nutrition research*, 51: 100-113.
- Weiss, W. P. (1998). Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: A review. *Journal of Dairy Science*, 81 (9): 2493-2501.
- Weiss, W. P., Hogan, J. S. & Wyatt, D. J. (2009). Relative bioavailability of all-rac and RRR vitamin E based on neutrophil function and total alpha-tocopherol and isomer concentrations in periparturient dairy cows and their calves. *Journal of Dairy Science*, 92 (2): 720-731.
- Yeargan, M. R., Oshidari, S., Mitchell, G. E., Tucker, R. E., Schelling, G. T. & Hemken, R. W. (1979). Mammary transfer of vitamin-E in cows treated with vitamin-A or linoleic-acid. *Journal of Dairy Science*, 62 (11): 1734-1738.

Muntlige referanser:

- Jensen, S.K. 2012. Ved institutt for Husdyrvitenskap, Foulum Forskningscenter, Århus Universitet. Den 17.01.12 kl. 14.10, Foulum, Danmark.
- Miladinovic, D.D. FôrTek, ved institutt for husdyr og akvakulturvitenskap, Universitet for miljø og biovitenskap. Den 25.03.12 kl 10.00, Ås, Norge.