

ARBEIDSBESKRIVELSE
Institutt for husdyr-og akvakulturvitenskap, NMBU

Metodenavn: Vannløselig karbohydrater (WSC)

BIOVIT-nr.: Arb1014

1. Innledning

Prøvene ekstraheres i acetatbuffer i romtemperatur over natt, før de filtreres. Sukrose og fruktaner i ekstraktet hydrolyseres ved hjelp av svovelsyre. Deretter konverteres monosakkaridene til glukose-6-fosfat (G-6-F) og fruktose-6-fosfat (F-6-F) ved en enzymatisk metode. G-6-F oksideres videre av NADP^+ som dermed reduseres til NADPH. Mengden NADPH dannet i denne reaksjonen tilsvarer mengden D-glukose. Deretter konverteres F-6-F til G-6-F som oksideres videre av NADP^+ og fører til enda en økning i NADPH nivået. Denne økningen tilsvarer mengden D-fruktose. Absorbansen for NADPH før og etter reaksjonen måles spektrofotometrisk. Økningen i absorbansen er direkte proporsjonal med glukose og fruktose konsentrasjonen. Analysen gir totalsummen av monosakkarider, sukrose og fruktaner som **ett** resultat.

Resultatene har vist tilfredsstillende samsvar med en lignende metode som benyttes ved SLU ($R^2 = 0,89, 0,99$ og $0,98$ for henholdsvis rå, frysetørka og ovns-tørka prøver).

2. Reagenser

0,05M Acetate buffer pH 5.0:

- Løsning 1: 13,61 g Natrium- acetat* $3\text{H}_2\text{O}$ løses i 2 L vann (RO), bruk målekolbe 2 L.
- Løsning 2: Fortynn 3,003 g eddiksyre i 1 L vann (RO), bruk målekolbe 1 L.
- Bland løsning 1 og løsning 2 til pH 5.0 (ratio ca. 2:1)
- Tilsett 280 mg Kalsiumklorid (CaCl_2) per L løsning

0,074M H_2SO_4 :

- 4,1 mL konsentrert svovelsyre (H_2SO_4) til ca. 800 mL vann i 1 L målekolbe
- Fyll opp til 1 liter med destillert vann (RO)

Kit:

Megazyme, D-Fruktose/D-Glucose assay kit, K-FRUGL. (Megazyme, Wicklow, Ireland).

3. Risikovurdering

Svovelsyre (H_2SO_4) er sterkt etsende. Ved søl: Skyll straks med store mengder vann. Eddiksyre er sterkt etsende og brannfarlig. Unngå innånding av damp. Ved søl: Skyll straks med store mengder vann. Søl av større mengder på gulv-trekk opp med absorbent før vask med vann.

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Inger Johanne Jørgensen	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 01.10.2009	Revisjon 02.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn ettusenogfjorten 00/00	Side 1-5

4. Utstyr

- Vekt
- Ultra Torax (*hvis prøvene ikke er malt*)
- Magnetrører
- Vannbad
- 250 mL erlenmeyer kolber (alternativt 150 mL)
- Foldefilter
- 10 mL reagensrør med kork
- Eppendorfrør
- Engangskyvetter 1cm – PMMA macro (cat.no.VWR: 634-0677)
- UV-VIS Spektrofotometer

5. Spesielle merknader

Analyse i frysetørka eller ovnstørka, malte prøver har erfaringsmessig gitt 60-80 % av nivået en får i ikke-tørka (rå-prøver) av gras og sårfor, uten at en kjenner årsaken til dette.

Nivåforskjeller mellom rå og tørka prøver var ubetydelig større for ovnstørking enn frysetørking, og klart større for surfôr-prøver (60-80 % av rå-prøven) enn for gras-prøver (77-81 % av rå-prøven). Prøvematerialet kan alternativt ekstraheres i kokende vann. Dette har gitt om lag samme nivå som ekstraksjon i acetatbuffer for rå prøver, men noe lavere nivå for frysetørka og ovnstørka prøver. Dette gjelder særlig for surfôr. Løsning i acetatbuffer ser ut til å gi mer stabil avlesning på spektrofotometer.

Denne prosedyren passer for prøver med forventede WSC verdier mellom 1-25 %. Er verdiene forventet å være høyere/lavere må innveid mengde og/eller volum av buffer justeres

6. Prøvemateriale

Det analyseres direkte i ferskt eller frosset gras, surfôr eller andre fôrvarer.

7. Arbeidsbeskrivelse

A: Råprøver og ikke-malte prøver

- 1a) Klipp 2-3 g prøve i så små biter som mulig og vei inn ca 1 g av den finklippte prøven
- 2a) Overfør prøven til en 250 mL erlenmeyerkolbe
- 3a) Tilsett 80 mL 0,05M Acetatbuffer
- 4a) Homogeniseres på benk med Ultra Tourax (m/ stor kniv) til det blir en jevn løsning
- 5a) Bruk 20 mL Acetatbuffer til å skylle prøverester ut av kniven

B: Tørre og malte prøver

- 1b) Vei inn ca 1 g prøve
- 2b) Overfør prøven til en 150 eller 250 mL erlenmeyerkolbe
- 3b) Tilsett 100 mL 0,05M Acetatbuffer

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Inger Johanne Jørgensen	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 01.10.2009	Revisjon 02.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn ettusenogfjorten 00/00	Side 2-5

Felles for alle prøvetyper

- 6) Tilsett magnet og sett prøvene på magnetrører i 5 min
- 7) Sett parafilm over erlenmeyerkolbene
- 8) La stå å ekstrahere over natt (ca 1 døgn) i romtemperatur
- 9) Neste dag filtreres prøvene med foldefilter
- 10) Hell kun litt av prøven i filteret og kast de 10 første mL av filtratet
- 11) Resten av filtratet samles opp i egnet beholder (f.eks 150 mL erlenmeyerkolbe)
- 12) Merk eppendorfrør og 10 mL reagensrør m/kork
- 13) Ha ca 1 mL prøve i eppendorf-røret og frys ned (reserveprøve)
- 14) Pipetter 0,5 mL i reagensrøret (dette er prøven som skal videre til hydrolyse)

Her kan prøven fryses ved -20 °C frem til hydrolysen

Hydrolyse:

- 15) 0,5 mL prøve tilsettes 0,5 mL 0,074 M H₂SO₄
- 16) Prøvene settes på vannbad ved 80 °C i 70 min
(Poly- og disakkarider i ekstraktet hydrolyseres nå til glukose og fruktose)

Info om «D-fructose & D-glucose kit» fra megazyme

- Kittet holder til ca 110 bestemmelser og inneholder:
- Flaske 1: Brukes som den er (stabil > 2 år ved 4 °C)
- Flaske 2: Innholdet løses i 12 mL destillert vann (stabil > 1 år ved 4 °C)
 - o Kan deles opp og fryses ved -20 °C (stabil > 2 år)
- For å lese av vannløselig sukker (WSC = glukose + fruktose) overføres alt innholdet av flaske 4 over i flaske 3 (snurr flaskene forsiktig rundt før de åpnes)
Blandes forsiktig og lagres stående (stabil > 2 år ved 4 °C)
- Flaske 5 brukes som den er, og kun som en kontroll hvis man mistenker at spektrofotometeret er unøyaktig (stabil > 2 år ved 4 °C)

OBS: Det er også mulig å lese av glukose og fruktose hver for seg, men da skal flaske 3 og 4 IKKE blandes og det skal avleses en ekstra gang. Se «assay procedure» del A for mer info.

Avlesning på spektrofotometer

Hentet fra «assay procedure» - del B: Manual assay procedure; total reducing sugars:

- 17) Skru på spektrofotometer (instrument går gjennom en rekke selv-tester) + printer
- 18) Trykk på «**GOTO WL**» på frontpanel – skriv inn «**340**», trykk «ok»
- 19) Bruk 1 cm kyvette (engangs PMMA macro/VWR)
- 20) Sett en kyvette med destillert vann i første posisjon, lukk lokket og trykk «**AUTOZERO**» på frontpanel
- 21) Pipetter vann, prøve, løsning 1 og løsning 2 i en ny kyvette (Se tabell under for detaljer)

Pipetter i kyvetten	Blank	Prøve
Destillert vann (25 °C)	2,10 mL	2,00 mL
Prøve	-----	0,10 mL
Løsning 1	0,10 mL	0,10 mL
Løsning 2	0,10 mL	0,10 mL

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Inger Johanne Jørgensen	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 01.10.2009	Revisjon 02.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn ettusenogfjorten 00/00	Side 3-5

- 22) Sett lokk på kyvetten og vend flere ganger for å mikse
- 23) Gjenta punkt 21 og 22 for alle prøvene inkludert en blank (uten prøve)
- 24) Vent ca 3 minutter
- 25) Sett kyvetten ned i første posisjon og lukk lokket
- 26) Trykk på START/STOP på frontpanelet (kommer inn i et nytt bilde)
- 27) Sjekk at det står «photometric» øverst og at bølgelengden er 340 nm
- 28) Avles absorbans (A_1) ved å trykke «START/STOP»
- 29) Resultatene printes fortløpende, men noter ned absorbansen også

30) Etter at alle prøvene er avlest første gang: tilsett blanding 3&4 i alle kyvettene (se tabell under for detaljer)

Pipetter i kyvetten	Blank	Prøve
Blanding 3 & 4	0,04 mL	0,04mL

- 31) Sett lokk på kyvetten og vend flere ganger for å mikse
- 32) Gjenta punkt 30 og 31 for alle prøvene + blank
- 33) Vent 10 minutter*
- 34) Avles absorbans (A_{total}) ved å trykke «START/STOP»
- 35) Noter ned absorbansen
- 36) Skru av spektrofotometeret + printer når alle prøvene er avlest

**Hvis reaksjonen ikke har stoppet etter 10 min, fortsett å lese av med 2 min mellomrom helt til absorbansen er stabil over 2 min.*

(Hvis reaksjonen fortsetter å øke, kan dette skyldes effekten av fargeforbindelser eller enzymer i prøven. Disse interferensene kan bli fjernet under prøveprepareringen.)

8. Utregning

Alle ligninger ligger inne i arbeids-arket for WSC (rekvisisjonsarket).

Bestem absorbans-forskjellen ($A_{\text{total}} - A_1$) for både blank og prøver.

Trekk fra absorbansforskjellen i blanken fra absorbansforskjellen i prøven.

Det er: $\Delta A_{\text{D-glukose+ D-fruktose}}$.

Verdien av $\Delta A_{\text{D-glukose+ D-fruktose}}$ skal som regel være minst 0,100 absorbanse-enheter for å oppnå sikre resultater.

Konsentrasjonen av D-glukose og D-fruktose kalkuleres slik:

$$C = \frac{V \cdot MW \cdot \Delta A}{\epsilon \cdot d \cdot v} \text{ (g/L)}$$

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Inger Johanne Jørgensen	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 01.10.2009	Revisjon 02.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn ettusenogfjorten 00/00	Side 4-5

hvor:

V = sluttvolum = 2,34 mL

MW = molekylvekt av D-glukose eller D-fruktose = 180,16 g/mol

ϵ = Extensjonskoeffisient for NADPH ved 340nm = 6300 (l * x mol⁻¹ * cm⁻¹)

d = lysveien (cm) = 1

v = prøvevolum (mL) = 0,1

Konsentrasjonen av D-glukose + D-fruktose (total sukker):

$$C = \frac{2,34 * 180,16}{6300 * 1 * 0,1} \Delta A_{D\text{-glukose} + D\text{-fruktose}} = 0,6692 * \Delta A_{D\text{-fruktose}} \text{ (g/l)}$$

*Hvis prøven er fortynnet, må resultatet multipliseres med fortynningsfaktoren!
(normal fortynning = 1:1 med syre). Dette ligger inne i excelarket, men gjelder kun prøvene,
IKKE standarden.*

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Inger Johanne Jørgensen	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 01.10.2009	Revisjon 02.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn ettusenogfjorten 00/00	Side 5-5