



Statens Husdyrbrugsforsøg 1987

Meddelelse

27. AUGUST

NR. 673

Ny metode til bestemmelse af letfordøjelige kulhydrater

Sigurd Boisen
Centrallaboratoriet

I forbindelse med indførelse af en ny metode til bestemmelse af letfordøjelige kulhydrater ved Centrallaboratoriet, er der udført sammenlignende analyser mellem den tidligere og den nye metode for en række af de vigtigste foderstoffer.

Den nye metode, der er baseret på en farvereaktion med ferricyanid, er nemmere at udføre og er desuden mere reproducerbar end den tidligere, der var baseret på en farvereaktion med Anthrone i 70% svovlsyre. Ferricyanid-metoden anvendes til bestemmelse af lethydrolyserbare kulhydrater (LHK), sukker og lactose. De 2 metoder giver overensstemmende resultater for LHK og sukker i næsten alle foderstoffer, dog giver ferricyanid-metoden generelt lavere og mere rigtige værdier for sukker og LHK i soyaskrå, og for sukker i roer og melasse. Lactosebestemmelsen i mælk er ens med de to metoder.

Indledning

Bestemmelse af letfordøjelige kulhydrater ved Statens Husdyrbrugsforsøg har igennem en år-række været udført med Anthrone-metoden, der er baseret på en farvereaktion mellem Anthrone og det produkt, der dannes ud fra frie hexoser (glucose, fructose, galactose m.m.) efter reaktion med 70% svovlsyre. Lethydrolyserbare kulhydrater (LHK) og sukker bestemmes i almindelige foderprøver med glucose som standard. Lactose bestemmes i rene mælkeprodukter med lactose som standard. Metoden giver ved omhyggelig udførelse en rimelig nøjagtig bestemmelse af de enkelte fraktioner i kornprøver og i de fleste andre foderstoffer, men på grund af en række praktiske problemer i forbindelse med metodens udførelse, bl.a. som følge af Anthronereagensets ustabilitet,

samt svovlsyrens høje viscositet og ætsende virkning på måleudstyret, har det været ønskeligt at indføre en ny metode til erstatning af Anthrone-metoden. Hertil blev valgt en spektrofotometrisk metode, der er baseret på de reducerende kulhydraters omdannelse af det farvede ferricyanid til det ufarvede ferrocyanid. Denne metode er angivet i »Official Methods of Analysis«, og er videreudviklet på Bioteknisk Institut i Kolding, hvorfra den er modificeret til brug på Centrallaboratoriet. Da den tidligere metode (Anthrone-metoden) imidlertid primært bestemmer monohexoser, kan det ikke på forhånd udelukkes, at nogle prøvetyper vil give forskellige resultater med de to metoder. I de fleste prøvetyper består sukkerfraktionen dog hovedsageligt af sucrose (disaccharid, der er opbygget af glucose og fructose) og

frie hexoser (især glucose og fructose). Da disse 2 monohexoser giver samme farverektion ved kompleksdannelse med Anthrone og endvidere har samme reducerende egenskaber over for ferricyanid følger heraf, at sukkerindholdet i de pågældende prøvetyper må forventes at blive nogenlunde ens bestemt med de 2 metoder.

For begge metoder gælder det, at farverektionen med lactose (galactose) er anderledes end med glucose og fructose. Dette betyder, at LHK i sødmælkserstatninger, der indeholder både lactose og stivelse/sucrose, ikke kan bestemmes nøjagtigt med nogen af de to metoder. Det er dog muligt at korrigere LHK-værdien i sådanne prøver på grundlag af en specifik enzymatisk bestemmelse af galactose.

LHK betragtes almindeligvis som summen af sukker og stivelse, og stivelsesindholdet vil således kunne beregnes ud fra differensen mellem LHK og sukker. Imidlertid er ferricyanid-metoden ligesom Anthrone-metoden ikke specifik, og desuden er hverken LHK eller sukker så veldefinerede som stivelse, der udelukkende er opbygget af glucose. En mere nøjagtig bestemmelse af stivelse vil derfor kunne opnås ved hjælp af en specifik glucosebestemmelse, og en enzymatisk metode hertil forventes indført på Centrallaboratoriet i efteråret 1987.

I denne meddelelse sammenlignes analyseresultaterne for LHK og sukker med de 2 metoder for en række af de vigtigste foderstoffer. Resultaterne for nogle af prøverne sammenlignes desuden med specifikke enzymatiske analyser af sukkerfraktionen.

Materialer og metoder

LHK

En formalet prøve opslemmes omhyggeligt i vand, hvori der er opløst en termostabil α -amylase (Termamyl, Novo). Prøvens indhold af stivelse forklister derefter under inkubation ved 100°C i 30 min., idet der samtidig sker en delvis enzymatisk nedbrydning af stivelsen til oligosaccharider (polymeriseringsgrad: 1-5), hvilket forhindrer dannelsen af vanskeligt nedbrydelige stivelsesmolekyler under den efterfølgende afkøling. Prøven inkuberes derefter ved pH 4,8 med en enzymblanding (bestående af amyloglucosidase og β -fructosidase) ved 53°C i 1 time. Amyloglucosidase nedbryder stivelsesfragmenterne

fuldstændigt til glucose, medens β -fructosidase spalter sucrose til glucose og fructose, samt spalter fructose fra eventuelle oligosaccharider. Efter klaring af prøven ved fældning af proteiner m.m. med zinksulfat (ved stuetemperatur i 30 min.) bestemmes indholdet af reducerende sukre spektrofotometrisk efter reaktion med ferricyanid (ved 80°C i 30 min.). Som standard anvendes glucose.

Sukker

En formalet prøve opslemmes omhyggeligt i vand. Der tilsættes β -fructosidase opløst i en natriumacetat-buffer (pH 4.8), hvorefter sukkeret ekstraheres (under jævnlig rystning ved 53°C i 1 time). Herved sker der en enzymatisk spaltning af sucrose til glucose og fructose, samt en fraspaltning af fructose fra oligosaccharider. Prøven klares og koncentrationen af reducerende sukre i supernatanten bestemmes som beskrevet under LHK-metoden.

Lactose

Mælk o.a. væsker fortyndes med vand, medens tørre prøver opslemmes i vand og lactosen ekstraheres under kraftig rystning ved stuetemperatur i 1 time. Prøven klares og koncentrationen af lactose i supernatanten bestemmes på samme måde som beskrevet under LHK-metoden, idet der dog som standard anvendes lactose.

Resultater og diskussion

Analyseresultaterne for indholdet af sukker og LHK i en række almindelige foderstoffer bestemt med henholdsvis ferricyanid- og Anthrone-metoden fremgår af tabel 1. Der er kun medtaget resultater for én typisk prøve fra hver foderstoftype, selv om undersøgelserne har omfattet 2-5 forskellige prøver af hver type. Resultaterne for hver metode er gennemsnittet af 2 sæt dobbelt-bestemmelser udført på forskellige dage. Standardafvigelserne er beregnet på alle 4 målinger.

Det fremgår af tabellen, at der for de fleste prøvetyper ikke var nogen signifikant forskel på resultatet, når de 2 metoder sammenlignes. I de tilfælde, hvor der var forskel i sukkerbestemmelsen var der normalt også en tilsvarende forskel i LHK-bestemmelsen, hvilket er et udtryk for at stivelsen som forventet bestemmes ens med de 2 metoder. I de fleste tilfælde, hvor der kunne konstateres en forskel i sukkerværdien, var resultatet med An-

Tabel 1. Indholdet (i % af tørstof) af sukker og LHK i almindelige foderstoffer og gødning som bestemt med ferricyanid- og Anthrone-metoden. Gennemsnit og standardafvigelse på 4 målinger.

	Sukker ^{a)}		LHK ^{b)}	
	Ferricyanid	Anthrone	Ferricyanid	Anthrone
Byg	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1	63,3 ± 0,9	63,9 ± 0,6
Hvede	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1	69,5 ± 0,9	68,6 ± 1,1
Rug	5,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	67,1 ± 1,0	68,0 ± 0,8
Triticale	4,8 ± 0,2	4,1 ± 0,4	65,1 ± 0,9	66,9 ± 0,9
Havre	2,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	52,1 ± 1,1	50,7 ± 1,3
Soyaskrå	11,1 ± 0,4	13,2 ± 0,2	13,2 ± 0,2	15,7 ± 0,3
Rapsskrå	9,0 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,9 ± 0,1	9,4 ± 0,1
Ærter	6,8 ± 0,1	7,6 ± 0,1	34,4 ± 0,9	35,0 ± 1,1
Kløver	11,0 ± 0,2	12,7 ± 0,6	11,3 ± 0,2	12,1 ± 0,2
Hø	10,7 ± 0,1	10,4 ± 0,1	10,0 ± 0,1	10,5 ± 0,5
Roer	58,9 ± 1,1	65,5 ± 0,7	56,3 ± 1,1	56,7 ± 1,1
Melasse	66,0 ± 0,7	73,3 ± 1,2	64,2 ± 0,3	62,6 ± 1,5
Vinasse	20,8 ± 0,3	20,4 ± 0,3	20,2 ± 0,2	18,3 ± 0,3
Fuldfoder	20,8 ± 0,3	21,9 ± 0,5	24,9 ± 0,2	24,7 ± 1,3
Kraftfoder	5,4 ± 0,1	5,2 ± 0,1	40,7 ± 0,9	41,6 ± 1,6
Gødning	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1

^{a)} beregnet som sucrose = glucose × 0,95

^{b)} beregnet som stivelse = glucose × 0,90

thronemetoden højest. Den væsentligste årsag hertil er formentlig, at svovlsyren i denne metode giver anledning til en uspecifik spaltning af oligosaccharider (især i soyaskrå) og vandopløselige fibre, f.eks. fructaner (især i rug). De vigtigste oligosaccharider er trisaccharidet raffinose (gal-glufu) og tetrasaccharidet stachyose (gal-gal-glufu), der tilsyneladende spaltes fuldstændigt til monosaccharidenderne af svovlsyren i Anthronemetoden. I ferricyanidmetoden fraspalter β -fructosidasen derimod kun oligosaccharidernes fructose. Til gengæld svarer dette netop til spaltningen i tyndtarmen, idet de øvrige monosaccharidender i vandopløselige fibre og oligosaccharider kun kan fraspaltes af mikrobielle enzymer i blind- og tyktarmen (samt i vommen hos drøvtyggere).

Også i roer og melasse fås ofte væsentligt højere sukkerværdier med Anthronemetoden. Disse værdier er givetvis for høje, da de er højere end de tilsvarende LHK-værdier. Årsagen til disse høje værdier er ikke blevet opklaret, men må hænge sammen med, at denne fraktion bliver isoleret efter ekstraktion med 40% alkohol, hvorved der tilsyneladende ekstraheres nogle stoffer ud, der reagerer med Anthrone-reagenset. Ved i stedet for at ekstrahere med vand, svarende til den tidligere anvendte bestemmelse af letopløselige kulhydrater (LOK) med Anthronemetoden,

opnåedes derimod værdier, der dels stemmer overens med sukkerbestemmelsen ved ferricyanidmetoden (tabel 2), dels svarer til LHK-værdien ved begge metoder. Dette stemmer også overens med at roer ikke indeholder stivelse.

Reproducerbarheden i de nærværende undersøgelser må anses for at være nogenlunde ens med de to metoder. De forskelle, der er i standardafvigelse for de enkelte prøver er forholdsvist tilfældige p.g.a. de få gentagelser. I praksis er der dog ingen tvivl om, at ferricyanidmetoden er mere reproducerbar, dels fordi den er nemmere at udføre, dels fordi den kan udføres på én dag, hvorimod Anthronemetoden normalt udføres over 3 dage. Selv om der er konstateret signifikante forskelle i sukkerfraktionen i en del af de undersøgte prøver, er det ikke altid et udtryk for et generelt forhold for alle prøver med de pågældende foderstoffer. Dog er det i alle undersøgte tilfælde konstateret lavere sukker- og LHK-værdier i soyaskrå med ferricyanidmetoden. Desuden er sukkerværdien i roer og melasse oftest for høj med Anthronemetoden.

I nogle af de vigtigste foderstoffer er sukkerfraktionen nærmere karakteriseret ved hjælp af specifikke enzymatiske metoder (tabel 2). Det fremgår heraf, at Anthronemetoden giver resultater, der ret nøje svarer til summen af de undersøgte kulhydrater, selv om oligosacchariderne i

Tabel 2. Karakterisering af sukkerfraktioner (i % af tørstof) med specifikke enzymatiske metoder efter normal ekstraktion.

	Glucose	Fructose	Sucrose	Oligo-Fructose	Total	Fructaner	Totalinkl. fructaner	Total (FeCy)	Total (Anthrone)
Byg	0.9	0.3	1.1	0.3	2.6	0.3	2.9	3.2	3.2
Hvede	0.8	0.2	1.2	0.4	2.6	0.7	3.3	3.5	3.4
Rug	2.2	0.5	0.9	1.0	4.4	2.2	6.6	5.8	6.8
Triticale	1.7	0.3	1.1	0.5	3.6	0.5	4.1	4.8	4.1
Soyaskrå	0.1	0.1	6.3	1.3	7.8	0.2	8.0	11.1	13.2
Rapsskrå	0.2	0.2	6.1	0.4	6.9	0.2	7.1	9.0	8.7
Ærter	0.1	0.1	3.5	1.2	4.9	1.6	6.5	6.8	7.6
Hø	4.0	4.4	0.3	0.3	9.0	1.7	10.7	11.8	11.4
Roer	11.8	13.5	23.5	3.0	51.8	4.8	56.6	58.4	(65.1)

soya- og rapsskrå kun bestemmes delvist med de anvendte enzymatiske metoder. Ferricyanid-metoden medbestemmer ikke fructaner, men synes derimod at bestemme andre reducerende kulhydrater, end de frie hexoser, der specifikt bestemmes med de enzymatiske metoder og som primært bestemmes med Anthrone-metoden. Det skal bemærkes, at indholdet af frie hexoser i nogle tilfælde er højere end forventet ud fra litteraturværdier. Dette synes at skyldes frigivelse under ekstraktionen på grund af en svag aktivitet fra endogene enzymer, idet fjernelse af disse enzymeres aktivitet (ved proteinfældning efter tilsætning af 1 M perchlorsyre til ekstraktionsbufferen) giver en tydelig reduktion i indholdet af de frie hexoser (tabel 3). Da det ikke er almindeligt an-

vendt at tilsætte perchlorsyre ved ekstraktionen af sukker, og da det giver problemer i den resterende analyseprocedure med ferricyanid-metoden, anvendes dette dog ikke i den beskrevne metode til almindelige foderanalyser. Dette giver således i nogle tilfælde anledning til en mindre forskydning mellem sukker- og stivelsesfraktionen, men påvirker ikke LHK-bestemmelsen.

Bestemmelse af lactose i mælk og rene mælkeprodukter synes ikke at volde problemer. Resultaterne fra de 2 metoder blev sammenlignet med resultaterne fra en specifik enzymatisk bestemmelse. Alle 3 metoder gav overensstemmende resultater.

Konklusion

Ferricyanid-metoden er væsentligt nemmere at udføre end Anthrone-metoden og vil i praksis være mere reproducerbar. Kun for nogle få af de undersøgte foderstoffer giver de 2 metoder signifikant forskellige resultater.

Ferricyanid-metoden må derfor anses for at være en god afløser for Anthrone-metoden, og metoden anvendes rutinemæssigt til bestemmelse af LHK, sukker og lactose i prøver, der er indsendt til Centrallaboratoriet efter 1. januar 1987.

Tabel 3. Effekten af 1 M perchlorsyre i ekstraktionsvæsken på enzymatiske bestemmelser af sukkerfraktioner (i % af tørstof).

	Normal ekstraktion			+ 1M perchlorsyre		
	Glucose	Fructose	Sucrose	Glucose	Fructose	Sucrose
Byg	0.9	0.3	1.1	0.03	0.07	1.1
Hvede	0.8	0.2	1.2	0.03	0.07	1.2
Rug	2.2	0.5	0.9	0.05	0.11	1.6
Soyaskrå	0.1	0.1	6.3	0.1	0.1	6.3
Ærter	0.1	0.1	3.5	0.1	0.1	3.4