

# BOGO van groene grondstoffen naar biobased materialen

## Van stro naar melkzuur

---

Wageningen UR Food & Biobased Research

R.R.C. Bakker, A.M. Lopez Contreras en L.A.M. van den Broek

### 1. Ontsluiting

#### 1.1 Materialen:

- Tarwestro
- Maalmolen voor het verkleinen van materiaal
- NaOH
- Centrifuge/buchnertrechter met filterpapier/kaasdoek
- Cellulase cocktail (enzymen)
- Erlenmeyer geschikt voor waterbad of lucht-verwarmde incubator
- Schudwaterback of schud-incubator
- Droogstoof
- Gekalibreerde pH meter of pH papier
- Optioneel: penstrep antibioticum (Sigma Aldrich P4458), geroerde bioreactor, viscositeitsmeter

#### 1.2 Tijdsplanning:

De proef kan desgewenst in 1 week of in 2 weken uitgevoerd worden, met analyse van monsters in de weken daarna. Voor uitvoering in 1 week kan het schema als volgt zijn:

- Maandag: stro vermalen, drenken in water/loog, start voorbehandeling, droge stofbepaling inzetten
- (voorbehandeling overnacht)
- Dinsdag: voorbehandeling stoppen, materiaal koelen en affiltreren/centrifugereren/uitwassen, start met pH stellen. Eventueel proefje met black liquor (vloeibare fractie/supernatant) uitvoeren. Droge stof bepalen van vloeistof/black liquor
- (opslag gewassen en pH gestelde materiaal overnacht)
- Woensdag: Laatste pH stelling van materiaal, start enzymatische hydrolyse, monstername, monster voorbereiden
- (enzymatische hydrolyse overnacht)
- Donderdag: na 24 uur hydrolyse de reactie stoppen, monstername, centrifugereren van het hydrolysaat, pH meten, droge stof meten, invriezen van het eindmonster
- Vrijdag: Optioneel: de enzymatische hydrolyse langer laten doorlopen en op vrijdag stoppen

##### 1.2.1 Raffinage van tarwestro

1) Voorbereiding malen/verkleinen/evt. vochtig maken

Vermalen van stro (droog) kan in een koffiemolen of een snijmolen. Het stro kan eerst met een schaar kleiner gemaakt worden zodat het in de molen past. Na vermalen is de deeltjesgrootte idealiter kleiner

dan 20 mm. Grovere deeltjes er eventueel uitzeven met een zeef. Tijdens malen mag het materiaal niet te warm worden, die heeft namelijk een nadelig effect op verdere processtappen.

N.B. Naast kopen van stro bij een lokaal boerenbedrijf is stro van goede kwaliteit meestal ook bij grotere dierenwinkels verkrijgbaar

Metten: droge stofgehalte van stro na vermalen (105 °C droogstoof, overnacht). Droog opgeslagen stro heeft meestal een drogestof. gehalte van 8 a 10 % (w/w). Hiermee rekeningen houden bij verdere berekeningen

### 1.2.2 Alkalische extractie

Een zuur extractie is meestal niet mogelijk i.v.m. hoge druk die hiervoor nodig is. De alkalische voorbehandeling gebeurt bij 90 °C, met een totale dosering van 7,5 % (w/w) NaOH op droge stof gehalte stro. Maak een stokoplossing van NaOH (pellets) in water. Neem een ruime beker of emmer en voeg de stokoplossing toe aan het vermalen stro. Goed roeren, in het begin zal het stro boven op de vloeistof gaan drijven maar na drenken/roeren verkrijgt je een suspensie/slurry. Na drenken/mengen een hoeveelheid materiaal overbrengen in de erlenmeyers of reactor.

N.B. in verband met veiligheid en spatten kan de eerste stap (drenken stro met water) ook met water zonder alkali plaatsvinden, hierna kan een (geconcentreerdere) oplossing van NaOH worden toegevoegd.

De behandeling uitvoeren in een erlenmeyer in schudwaterbak, of in een verwarmde geroerde reactor. Alkalische behandeling voor minimaal 4 uur bij 90 °C uitvoeren. (alternatief is overnacht). In een erlenmeyer: dosering zou ongeveer 5% (w/w) droge stof gehalte stro op het totaal zijn. In de geroerde reactor kan waarschijnlijk 10% (w/w) droge stof stro op het totaal gehaald worden.

Metten: pH aan het begin en aan het einde van de alkalische voorbehandeling bepalen. Meestal loopt de pH wat omlaag door vorming van organische zuren tijdens de voorbehandeling. Verder kunnen ook eventueel organische zuren en monomere suikers in het supernatant (black liquor) gemeten worden

Achtergrond/Opdracht/verdieping: onderzoek wat toepassingsmogelijkheden zijn voor black liquor.

Eventueel zou de pH van een vloeistofmonster verlaagd kunnen worden om lignine te precipiteren.

NB: als er in groepen gewerkt wordt zou je ook kunnen kiezen dat elk groepje een kleine verandering meeneemt in de voorbehandeling: bijvoorbeeld 6% (w/w) NaOH en 9% (w/w) NaOH als variatie.

### 1.2.3 Persen alkalisch voorbehandeld stro, en pH stellen voor enzymatische hydrolyse

Tijdens de alkalische voorbehandeling is een hoeveelheid lignine in oplossing gebracht, hierdoor heeft de vloeistof een donkerbruine kleur (black liquor). De opgeloste lignine moet verwijderd worden voordat de pH gesteld wordt.

Achtergrond/Opdracht/verdieping: onderzoek wat het mogelijke effect is van lignine op enzymatische hydrolyse.

Het verwijderen van lignine kan op verschillende manieren worden gedaan, afhankelijk van de grootte van het monster, en beschikbare apparatuur:

1. Kleine schaal: gebruik een centrifuge. Meerdere malen centrifugeren, het supernatant afgieten en pellet opnieuw in schoon water suspenderen, en opnieuw centrifugeren
2. Filtreren: giet het materiaal na alkalische voorbehandeling op een buchnertrechter met filterpapier; eventueel onder druk affiltreren en daarna wassen met extra schoon water (als het stro nog veel fines bevat is dit mogelijk een probleem doordat het filter dichtslibt)
3. Persen: giet het materiaal na alkalische voorbehandeling in een kaasdoek, knoop dit dicht en pers het materiaal uit. Na eerste persing de gehele kaasdoek in een emmer plaatsen en materiaal opnieuw drenken, en persen. Herhaal dit enkele keren totdat vloeistof lichter van kleur is geworden

Het gewassen materiaal kan goed bewaard worden in de koelcel (4 °C). Invriezen is niet noodzakelijk, aangezien het materiaal nog steeds een redelijk hoge pH heeft

Metten:

1. Massa totale hoeveelheid uitgeperst black liquor, droge stof gehalte en pH van deze vloeistof. Eventueel suikeranalyse (sectie 3.2) in deze vloeistof bepalen.

2. Massa totale hoeveelheid pellet/filtraat/uitgeperst materiaal en het droge stof gehalte daarvan bepalen.
3. Bepalen: massabalans van de droge stof: hoeveel is het van het ingangsgewicht aan stro/alkali.

pH Stellen: breng het gewassen materiaal opnieuw in contact met water, zodat de pH meetbaar is met een electrode. Gebruik verdund zwavelzuur om de pH te stellen voor enzymatische hydrolyse (bijv. pH 4.8). Alternatief is azijnzuur, dat ook voor een buffering van pH tijdens enzymatische hydrolyse zorgt. Als het materiaal ook voor ethanol fermentatie gebruikt wordt, is azijnzuur geen optie (remming van de gist). Het gewassen materiaal dat op pH gesteld is kan niet lang bewaard worden. Suggestie is om als bewaring nodig is voor langer dan een dag het niet te koelen maar in te vriezen.

NB: het komt veel voor dat na een eerste pH stelling, de pH weer omhoog loopt na ca. 30 minuten, aangezien alkali diffundeert van de vezel naar de omringende vloeistof. pH stelling daarom enkele malen controleren en opnieuw stellen.

#### 1.2.4. Enzymen toevoegen

Voor enzymatische hydrolyse van voorbehandeld stro, of andere typen lignocellulose, volstaat gebruik van een commercieel enzympreparaat, naast het alkalisch voorbehandelde materiaal uit de vorige processtappen.

Adviezen t.a.v. enzymatische hydrolyse:

- Probeer zoveel mogelijk adviezen van de fabrikant t.a.v. optimale temperatuur en pH te volgen. Deze staan vermeld in het productsheet.
- Enzympreparaten nooit invriezen maar koel en donker bewaren.
- Bekende cellulase cocktails zijn de Accelerase serie van Dupont (Genencor), of Ctec serie van Novozymes. Monsters voor onderzoek/onderwijs doeleinden zijn meestal verkrijgbaar direct van de fabrikant (meer informatie kun je ook op hun website vinden).
- Website Dupont: <http://accelerase.dupont.com/enzymes-for-unlocking-c5-c6-sugars/>
- Website Novozymes: <http://www.bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/Pages/default.aspx>
- Kleine hoeveelheden monsters zijn vaak ook te bestellen via Sigma Aldrich, maar deze monster zijn vaak te klein voor proeven op wat grotere schaal (erlenmeyers, bioreactor).
- Enzymdosering voor hydrolyse van lignocellulose zijn in de regel veel hoger in vergelijking met enzymatische hydrolyse van zetmeel. Dosering van 10 ml – 25 ml enzymcocktail per 100 gram droge stof voorbehandeld materiaal zijn niet ongebruikelijk.
- Tijdens de hydrolyse is het gebruikelijk dat de pH wat terugloopt. Als de pH na 30 uur een eenheid of meer terugloopt is er waarschijnlijk sprake van suikerconsumptie door micro-organismen. Een mogelijke optie is om een antibioticum (bijv. penstrep) toe te voegen. Het hydrolysaat is hierna echter niet meer geschikt voor fermentatie.
- Een pH buffer is niet noodzakelijk om te gebruiken.
- Bij tussentijdse monsternamen van materiaal voor analyse, het monster enkele minuten kokend water plaatsen om het enzym te denatureren/inactiveren. Hierna worden de suikers niet verder meer afgebroken.

Uitvoering: breng na pH stellen het voorbehandelde materiaal in een afgesloten erlenmeyer (idealiter erlenmeyers met schud/baffles tegen opkruipen van het monster). Alternatief is uitvoer van het experiment, indien voorradig, in een verwarmde geroerde reactor (zoals een bioreactor). Voeg voldoende water toe aan het monster zodat het enzym ingemengd kan worden. Neem een 0-monster van het materiaal alvorens enzym toe te voegen. Voeg de juiste dosering enzym toe (meestal 1 a 2 ml per 10 gram droge stof), en doe een eerste menging met een spatel. Zet de erlenmeyer(s) vervolgens in een schudbak of incubator bij de juiste incubatie temperatuur (veel cellulase werken optimaal bij 50 °C). Minimale incubatietijd is 24 uur. Bij lignocellulose type materialen vervloeit het materiaal, dit kan door studenten ook visueel vastgesteld worden. Eventueel kan ook viscositeit van monsters voor, tijdens, en na enzymatische hydrolyse gemeten worden.

Na afloop kan het gehele hydrolysaat ingevroren worden, voor later analyse of fermentatie. Een monster kan ook afgedraaid worden in een centrifuge, om een heldere suikeroplossing te verkrijgen. (zie ook fermentatie supernatant, sectie 2.2)

Metten: pH voor, tijdens en na hydrolyse. Suikers en organische zuren in het hydrolysaat. Na afloop: monster afdraaien in een centrifuge, dan het pellet (bestaat uit voornamelijk lignine en niet-omgezette cellulose) opnieuw suspenderen in water en opnieuw afdraaien, dit nog tweemaal herhalen. Het uiteindelijke pellet indrogen in een droogstoof en drooggewicht bepalen. Dit gewicht vergelijken met de ingangsdroge stof voorafgaande aan de hydrolyse. Dit geeft een goede indicatie van de hoeveelheid vaste stof (cellulose, hemicellulose) die tijdens de enzymatische hydrolyse in oplossing gegaan is i.e. gehydrolyseerd is. Als ook de (uiteindelijke) suikerconcentratie in het supernatant gemeten wordt, en deze wordt uitgedrukt per gram droge stof inweeg (begin hydrolyse) kan een globale massa balans van het experiment gemaakt worden.

### 1.2.5 Fed batch incubatie (optioneel).

Fed-batch dosering van voorbehandelde lignocellulose kan toegepast worden om een hogere suiker (en biomassa concentraties) te krijgen. Het is een techniek die vooral bij een geroerde reactor ingezet kan worden, maar ook bij enzymatische hydrolyse wordt uitgevoerd zoals beschreven onder 1.2.4, echter, men begint met een kleinere hoeveelheid water, enzym en voorbehandeld materiaal. Na verloop van tijd (1 uur afhankelijk van enzymdosering) vervloei het materiaal, en kan er voorbehandeld materiaal worden bijgevoegd (inclusief bijbehorende hoeveelheid enzym) in de erlenmeyer/reactor, zonder dat er extra verdunningswater wordt toegevoegd. Het fed-batch voeden kan in principe oneindig herhaald worden, alhoewel de werking van het enzym, en eventuele eindproduct inhibitie (hoge suikerconcentraties in het hydrolysaat remmen de enzymen) de vervloeiing zal vertragen. Een voorbeeld van een fed-batch experiment is als bijlage toegevoegd (Fed-Batch addition of base pretreated wheat straw to enzymatic hydrolysis). Hiertoe is het voorbehandelde materiaal bij relatief lage temperatuur voorgedroogd. Ook zijn enkele voorbeelden van enzymproductsheets toegevoegd.

## 2. Fermentatie

Voor de fermentatie van suiker naar melkzuur zijn er verschillende methoden. Bij Wageningen UR Food & Biobased Research gebruiken we met name *Bacillus coagulans* als productie micro-organisme, omdat deze zowel glucose als xylose kan fermenteren naar melkzuur. Voor melkzuurproductie zijn er geen speciale voorzieningen nodig in vergelijking met andere gangbare fermentatieprocessen.

### 2.1. Apparatuur en materialen

Apparatuur:

- Laminaire flowkast voor steriel werk
- Autoclaaf
- Steriliseerbare bioreactors
- Spectrofotometer voor OD bepalingen
- Schudincubator 50 °C

Chemicaliën en micro-organisme:

- Zouten
  - Yeast extract
  - Medium componenten
  - Ca(OH)<sub>2</sub>, voor pH aanpassingen
- Bacillus coagulans* DSM 2314. Te bestellen bij [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de).  
<http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html> (vul hier de stamnummer in 2314. De prijs is 50-100 euro voor een gedroogde cultuur.

## 2.2 Directe fermentatie

Na het maken van de hydrolysaten, moeten deze meteen gekoeld worden om te voorkomen dat er andere micro-organismen in gaan groeien, of het hydrolysaat moet direct gebruikt worden voor fermentatie. Voor een langere periode kunnen de hydrolysaten bij  $-20^{\circ}\text{C}$  of bij  $-80^{\circ}\text{C}$  bewaard worden. Bij de meeste experimenten moet het hydrolysaat helder zijn. Daarom wordt het gecentrifugeerd (gekoeld) als er nog vaste deeltjes in aanwezig zijn of eventueel gefiltreerd. *Bacillus coagulans* wordt gebruikt omdat deze bij hogere temperaturen melkzuur kan maken waardoor er minder kans bestaat op contaminatie van andere micro-organismen.

### 2.2.1 Reactie omstandigheden

Reactie-omstandigheden fermentor en erlenmeyer (medium, pH, micro-organisme) zijn hieronder beschreven. Als micro-organisme wordt *Bacillus coagulans* DSM 2314 gebruikt (kan gekocht worden bij de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)). Dit organisme kan worden bewaard als steriele glycerol suspensie (20% (w/v) glycerol) bij  $-80^{\circ}\text{C}$  in hoeveelheden van 1-2 mL.

Voor het maken van voorculturen wordt circa 1 mL glycerol suspensie geënt in 20 mL medium (in g per L: yeast extract 10,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.5, BIS-TRIS 20, glucose 10; pH 6.8) in een erlenmeyer en geïncubeerd gedurende 17-24 h bij  $50^{\circ}\text{C}$ .

Als de voorcultuur gegroeid is, wordt het gebruikt voor het enten van het hydrolysaat of eventueel in een ander medium. Meestal wordt 5-10 % (v/v) van de voorcultuur gebruikt. De suiker samenstelling van het medium varieert tussen 40 tot 60 g/L totale suikers (glucose en xylose). Een normale fermentatie duurt tussen 16 en 24 uur.

Een gangbare protocol voor batch fermentaties in een reactor is:

- 2 L bioreactor (dubbelwandig) bij  $50^{\circ}\text{C}$  met een werkvolume van 1.0 L.
- Medium (in g per L) yeast extract 5,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.5,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5, glucose 50, xylose 25, of een hydrolysaat die getest moet worden.
- Het medium wordt gesteriliseerd door middel van filtratie ( $0,2\ \mu\text{m}$  filter) om maillard reacties tussen eiwitten en suikers te voorkomen. Eventueel kunnen medium en de suikers apart geautoclaveerd worden en daarna samengevoegd worden.
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  wordt apart ge-steriliseerd doormiddel van filtratie en toegevoegd op  $50^{\circ}\text{C}$  om neerslag te voorkomen.
- De bioreactor wordt leeg geautoclaveerd (20 min,  $121^{\circ}\text{C}$ ).
- De pH wordt gesteld tussen 6.3 – 6.4 (kamer temperatuur) en wordt constant gehouden door automatische toevoeging van 16.6 % (w/w) calcium hydroxide suspensie.
- De consumptie van alkali wordt online geregistreerd.
- De culturen worden continu geroerd bij 150 rpm.
- De fermentatie wordt gestart door het toevoegen van de inoculum (5-10 % (v/v)).
- De fermentatie is compleet als de toevoer van alkali is gestopt.
- Monsters van 4 mL worden regelmatig uit de bioreactor genomen voor analyses.
- Monsters worden bewaard bij  $-20^{\circ}\text{C}$  tot gebruik.

Voor batchfermentaties in erlenmeyers kunnen dezelfde condities worden aangehouden. Echter de volumina moeten worden bijgesteld. Omdat het niet mogelijk is om online de pH te stellen zal er of een buffer gebruikt moeten worden of batchgewijs de pH stellen met de hand. Tijdens het pH stellen kan men ook monsters nemen om hierna de suikeropname en/of melkzuurproductie te meten.

### 2.2.2 Isolatie melkzuur

Bij Wageningen UR Food & Biobased Research hebben we op dit moment geen standaard isolatie van melkzuur uit het medium. Melkzuur dat gebruikt kan worden voor polymerisatie moet een hoge zuiverheid hebben. Verschillende stappen zijn nodig om dit te bereiken. Een protocol wat gebruikt kan worden is het volgende: melkzuur bevindt zich in de oplosbare fractie van het medium als calcium-lactaat. Als de fermentatie klaar is (het liefst als alle glucose is omgezet om de zuivering beter te laten verlopen), wordt het medium op pH 10 gebracht met  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Om de cellen af te doden en de eiwitten te coaguleren wordt het geheel bij  $80^{\circ}\text{C}$  verhit gedurende 10 minuten. Onoplosbaar materiaal wordt gescheiden door centrifugatie (30 min,  $10000 \times g$ , kamertemperatuur). Het supernatant wordt met actieve kool behandeld (5% (w/v)) om te ontkleuren. Dit wordt gedurende 30 min bij  $25^{\circ}\text{C}$  geroerd bij 250 rpm. Hierna wordt de actieve kool verwijderd door centrifugatie (30 min,  $10000 \times g$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ). Aan het

supernatant wordt zwavelzuur toegevoegd om het Ca-lactaat om te zetten in melkzuur. De hoeveelheid zwavelzuur dat moeten worden toegevoegd is 1:1 t.o.v. van melkzuur. Men kan ook een hoeveelheid zwavelzuur toevoegen dat de pH uiteindelijk  $\sim 4$  wordt. Dit is de optimale conditie om het meeste calciumsulfaat gevormd te krijgen. Het mengen kan overnacht plaats vinden onder roeren (250 rpm). Het calciumsulfaat kan verwijderd worden door middel van centrifugatie (30 min,  $10000 \times g$ ,  $25^\circ\text{C}$ ). Hierna wordt het supernatant met daarin melkzuur m.b.v. een filmverdamp(er) ingedampt. Let op dat dit laatste plaatsvindt onder een zo laag mogelijke temperatuur en druk. Bij te hoge temperatuur kan er oligomelkzuur gevormd. Wil men de melkzuur nog zuiverder in handen krijgen dan kan het melkzuur veresterd worden met methanol. Deze reactie vindt plaats bij  $60^\circ\text{C}$  met een methanol:lactic acid ratio van 3:1. Geconcentreerd zwavelzuur wordt toegevoegd tot men een eindconcentratie heeft van 5 mM (0,022 g zwavelzuur per 45 ml). De reactie wordt uitgevoerd gedurende 2-3 uur onder refluxen. Na de reactie kan de methylester worden gedestilleerd. Aan de methylester kan een overmaat water worden toegevoegd en door vervolgens te koken wordt de methyl lactaat afgebroken tot melkzuur. M.b.v. destillatie kan het melkzuur geconcentreerd worden. Let op gebruik lage temperaturen en lage druk. In plaats van de centrifugatiestappen kan men ook filtreren. De hoeveelheid melkzuur dat gevormd wordt uit glucose (volledige omzetting) is ongeveer 85% op gewichtsbasis.

### 3. Analyse methoden

#### 3.1. Analyse van metabolieten van de fermentatie

De meeste metabolieten in de monsters van de fermentatie worden via HPLC gemeten. Monsters worden eerst gecentrifugeerd (3 min,  $17400 \times g$ ) om cellen te verwijderen. Het heldere supernatant wordt 2x verdund met 1 M zwavelzuur met 250 mM propionzuur als interne standaard. Monsters worden gefiltreerd ( $0,2 \mu\text{m}$ ) om vaste deeltjes te verwijderen. Voor analyse van melkzuur worden de monsters die genomen zijn eerst 10 min bij  $70^\circ\text{C}$  verwarmd. Dit is nodig om het calciumlactaat goed op te lossen voordat men de monsters centrifugeert.

Suikers kunnen worden geanalyseerd met een HPLC met een Alltech IOA-1000 column (Fischer) bij  $90^\circ\text{C}$ , met 3 mM zwavelzuur als mobile fase ( $0,4 \text{ mL per min}$ ), gevolgd door RI-detectie. Organische zuren kunnen worden geanalyseerd met behulp van een HPLC uitgerust met een Shodex ionpak KC811 kolom (Waters) bij  $80^\circ\text{C}$ , met 3 mM zwavelzuur als mobile phase ( $1,0 \text{ mL per min}$ ), gevolgd door UV ( $210 \text{ nm}$ ) detectie en RI.

#### 3.2 Suikerbepalingen

##### 3.2.1. Totaal suikergehalte (fenol zwavelzuurtest).

Het totale oplosbare suikergehalte kan bepaald worden door middel van de fenol/zwavelzuur test.

##### Materialen

- 2,5 % (w/v) fenol (let op giftig)
- 95-97% zwavelzuur (corrosief) in een fles met dispensette.
- 20 mL glazen cultuurbuizen
- 0,15 mg/mL glucose-oplossing (standaard)
- Spectrofotometer (doorstroomcuvet i.v.m. het feit dat zwavelzuur de spiegels van de spectrofotometer kan aantasten).

##### Werkwijze

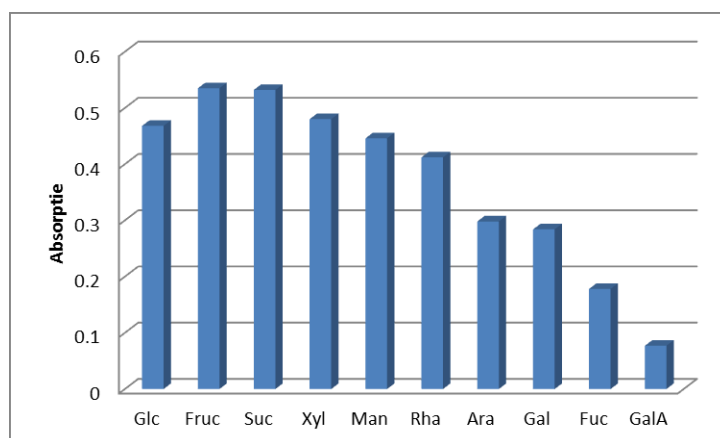
- Standaardreeks. Voeg 0, 50, 100, 150 en 200  $\mu\text{L}$  glucose-oplossing aan de cultuurbuizen en voeg respectievelijk 1000, 950, 850 en 800  $\mu\text{L}$  2,5 % (w/v) fenol-oplossing toe.
- Neem van je monster 100  $\mu\text{L}$  en voeg 900  $\mu\text{L}$  2,5 % (w/v) fenol-oplossing toe.
- Voeg, mixend op een vortex, 2,5 mL zwavelzuur (snel) toe.
- Na goed mengen de oplossing 5 à 10 minuten laten staan.
- De absorptie van de oplossingen worden bij 490 nm gemeten.

- Zorg ervoor dat de absorptie van je monsters tussen de waarden van de ijklijn vallen. Zijn de waarden te hoog dan moet je het monster verdunnen voor de bepaling.

#### Opmerkingen

De verschillende suikers geven een andere respons in de assay (Figuur 1). Omdat men voornamelijk glucose maakt of verwijderd kan deze bepaling toch toegepast worden.

Referentie: Dubois, M., Gilles K.A., Hamilton, J.K., Rebers, D.A. and Smith, F. (1956) *Analytical Chemistry* 28, 1956, 350-356.



**Figuur 1:** Respons van 200 µg/mL monosacchariden in de fenol/zwavelzuur test. Glc is glucose, Fruc is fructose, Suc is sucrose, Xyl is xylose, Man is mannose, Rha is rhamnose, Ara is arabinose, Gal is galactose, Fuc is fucose en GalA is galacturonzuur.

#### 3.2.2. Reducerende eindgroepen met de Nelson-Somogyi methode

Een spectrofotometrische bepaling om de reducerende eindgroepen te bepalen van suikers is de Nelson Somogyi-methode. Het principe is dat  $\text{Cu}^{2+}$  wordt gereduceerd bij de reducerende eindgroepen van suikers naar  $\text{Cu}^+$ . Dit zal vervolgens arseenmolybdaat reduceren naar molybdeenblauw dat een blauwe kleur heeft die gemeten kan worden bij 520 nm.

#### Materialen

##### Koperreagens:

Oplossing A1: 15 g K-Na-tartraat (Rochelle salt; CAS nummer: 6381-59-5) en 30 g natriumcarbonaat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 497-19-8) worden in 300 mL demi-water opgelost en vervolgens wordt 20 g natriumwaterstofcarbonaat toegevoegd ( $\text{NaHCO}_3$ ; 144-55-8). 180 g Natriumsulfaat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 7757-82-6) wordt opgelost in 500 mL heet demi-water en de oplossing wordt gekookt om alle lucht te verwijderen. Na afkoelen worden beide oplossingen gemengd en aangevuld tot 1 L met demi-water.

Oplossing A2: 5 g kopersulfaat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 7758-99-8) en 45 g natriumsulfaat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 7757-82-6) worden opgelost in 250 mL demi-water.

Voor gebruik (vers) worden de oplossingen A1:A2 gemengd in de verhouding 4:1

##### Arseenmolybdaat Reagens:

Oplossing B1: 26.5 g ammoniumheptamolybdaat tetrahydrate (12054-85-2) wordt in 450 mL demi-water opgelost en hieraan wordt onder roeren 21 mL geconcentreerd  $\text{H}_2\text{SO}_4$  toegevoegd.

Oplossing B2: 3 g  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10048-95-0) wordt in 25 mL demi-water opgelost.

Oplossing B3: De oplossingen B1 en B2 worden samengevoegd en geïncubeerd gedurende 24-48 uur bij 37°C. Bewaar hierna de oplossing in een bruine fles.

Oplossing B4: 1.5 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10.25 mL geconcentreerd  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in 250 mL demi-water).

Voor gebruik worden de oplossingen B3:B4 gemengd in de verhouding 1:2.

IJKlijn: 0-150 µg/mL reducerende suikeroplossing (b.v. glucose).

#### Werkwijze

- Een ijklijn wordt gemaakt van 0-150 µg/mL reducerende suikers (bijvoorbeeld glucose). Hiervoor wordt 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 en 3 mL van een 150 µg/mL glucose stokoplossing aan reageerbuizen toegevoegd. Met demi-water wordt het volume aangevuld tot 3 mL.
- Neem 150 µL van elke oplossing en behandel die hetzelfde als het monster.
- Pipeteer 150 µL sample in een reageerbuis (zorg ervoor dat de concentratie binnen de ijklijn valt).
- Voeg 150 µL koperreagens toe.
- Bedek de buizen met aluminiumfolie en incubeer de buizen gedurende 10 minuten in een kokend waterbad.
- Laat de monsters afkoelen tot kamertemperatuur.
- Voeg 150 µL arseenmolybdaatreagens toe en meng voorzichtig door te zwenken of kort te vortexen (teveel zuurstof zal de bepaling beïnvloeden).
- Voeg 1 mL demi-water toe en meng voorzichtig.
- Meet de absorptie bij 520 nm na 30 minuten (wanneer er een neerslag aanwezig is deze verwijderen door 5 minuten te centrifugeren).

#### Opmerkingen

Door hydrolyse van suikerpolymeren en oligomeren zal de hoeveelheid reducerende eindgroepen van suikers toenemen. Bij het omzetten van glucose naar melkzuur zal de hoeveelheid suikers afnemen en dus ook de totale hoeveelheid reducerende eindgroepen.  
Let op dat arseenmolybdaat giftig is.

#### Referenties

Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380.  
Somogyi, M (1952) Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-25.  
Spiro, R.G. (1966) Analysis of sugars found

#### Testkits

Testkits kunnen ook gebruikt worden voor het aantonen van:

#### Melkzuur

Bij r-biopharm: <http://www.r-biopharm.com/>  
<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/constituents/enzymatic-analysis/roche-yellow-line/item/l-lactic-acid>  
<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/constituents/enzymatic-analysis/roche-yellow-line/item/d-lactic-acid-l-lactic-acid>  
Bij megazyme: <http://www.megazyme.com/>  
<http://secure.megazyme.com/L-Lactic Acid L-Lactate>  
<http://secure.megazyme.com/D- L-Lactic Acid D- L-Lactate Rapid>  
<http://secure.megazyme.com/D-Lactic Acid D-Lactate Rapid>

#### Glucose

Bij r-biopharm: <http://www.r-biopharm.com/>  
<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/constituents/enzymatic-analysis/roche-yellow-line/item/d-glucose>  
Bij megazyme: <http://www.megazyme.com/>  
<http://secure.megazyme.com/D-Glucose GOPOD Format>  
<http://secure.megazyme.com/D-Glucose-HK Regular>