

Metodenavn: aNDFom (askekorrigert)

BIOVIT-nr.: Arb-1042

1. Introduction/Purpose

The digestibility of food and feed is determined by the amount of "neutral detergent fibre" (NDF) in the specific food/feed. The more NDF, the longer it will take for the animal to digest the feed and vice versa. This method for determining NDF was developed over 30 years ago and it is today the most used method of determining the total fiber content of animal feed.

Prøven varmes opp i en nøytral såpeløsning (neutral detergent solution, ND-løsning) slik at innholdet i cellene løser seg mens celleveggen forblir uløst. Denne uløste fraksjonen (NDF) består av hemicellulose, proteiner bundet til celleveggene, cellulose, ligning og silikater, og det er dette som bestemmes i denne analysen. Den løselige fraksjonen, "neutral detergent solubles" (NDS) består av lipider, sukker, organiske syrer, vannløselige forbindelser, pektin, stivelse, nitrogen som ikke stammer fra proteiner og vannløselige proteiner.

Stivelse er den vanskeligste fraksjonen å fjerne da den har begrenset løselighet i ND-løsningen. Man tilsetter derfor i dag også et enzym, *α-amylase*, til såpeløsningen for å bryte ned stivelsen i prøven. Uten dette enzymet vil ikke all stivelsen bli løst og man vil dermed oppleve forhøyede NDF-verdier. Enzymet bryter ned, hydrolyserer, stivelsen til sakkarider som løser seg i vann og dermed vaskes bort fra prøven. NDF-fraksjonen man står igjen med kalles gjerne aNDF hvor **a** står for *α-amylase*. Varmestabile amylaser brukes i varme løsninger slik at andre enzymer som kan løse fibermateriale inaktiveres og dermed ikke forstyrr analysen.

aNDF-fraksjonen som bestemmes inneholder som oftest en liten del uorganisk materiale, og denne kan korrigeres for ved å foraske prøven ved 550 °C. Restene etter foraskningen er et mål på den uorganiske delen av prøven og man kan da bestemme det som blir kalt *askekorrigert aNDF*, eller *aNDF on organic matter basis*, (aNDFom).

2. Reagenser og kontrollprøve

- "Neutral Detergent"- løsning:
 - konsentratet (Ankom, FND20C) løses i 18 L kaldt RO-vann i en kanne på 20 L med tappekran
 - tilsett trietylenglykol og rør godt
 - la løsningen stå over natt og fyll opp med RO-vann til 20 L
 - pH skal ligge mellom 6,9 og 7,1
- Vannfri natriumsulfitt (Na₂SO₃)
- Varmestabil *α*-amylase (Ankom, FAA)

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Michel Brunet Berg	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 03.2013	Revisjon 03.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn 1042_SOP_aN DFom_ENG	Side: 1/6

- Aceton
- Kontrollprøve: LabTek-kontrollen (miks til NDF/ADF/trevler/kjeldahl-N)

3. Risikovurdering

Etter koking og skylling **MÅ** avløpskrana på venstre side av instrumentet åpnes (loddrett = åpen) før lokket på kammeret åpnes. Hvis dette ikke gjøres vil det varme innholdet i kammeret sprute på de personene som står rundt instrumentet. Dette skjer på grunn av overtrykket som oppstår i kammeret under kokingen og skyllingen.

VIKTIG: Foraskningsovnen må ikke åpnes på 550 °C. Hvis det fortsatt er organisk materiale igjen vil en flamme slå ut når døren åpnes!

Bruk tang og evt. hansker når du skal ta ut prøvene av askeovnen.

Skulle du brenne deg; bruk rennende kaldt vann de første minuttene. Bruk så rennende lunket vann slik at frostskafer ikke oppstår.

4. Utstyr

- Ankom²⁰⁰ Fiber Analyser,
- Filterposer (F57 og F58 fra Ankom)
- Varmeforsegler
- Analysevekt (nøyaktighet: 0,1 mg)
- Tørkeskap (103 ± 2 °C)
- Eksikator
- Tusj (permanent marker)
- Kokeplate
- Vannkjele
- 5 mL målesylinder
- Lite målebeger
- Glass m/lokk
- Foraskningsovn (550 °C)
- Telleglass (som tåler over 550 °C)
- Stålbrett (til å sette prøvene i)

5. Spesielle merknader

NDF-metoden er en gravimetrisk metode hvor prøven veies før og etter behandling med ulike reagenser som skal fjerne alt som IKKE er NDF. Deretter antar man at det som er igjen i posen er NDF. Man må være klar over at i noen tilfeller får en overestimering av NDF innholdet fordi metoden ikke har klart å fjerne alt annet. Det kan for eksempel skje med prøver som har unormalt høye protein-nivåer. For å unngå dette bør man ta en prat med rekvirenter som leverer inn prøver med nye for-ingredienser eller prøver som kan antas avviker fra vanlig for. Da kan man gjøre en vurdering på forhånd og eventuelt justere metoden slik at overestimering av NDF kan unngås. For å fjerne høye verdier av protein kan man for eksempel tilsette et ekstra enzym.

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Michel Brunet Berg	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 03.2013	Revisjon 03.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn 1042_SOP_aN DFom_ENG	Side: 2/6

NDF metoden kan inngå i en sekvensiell analyse hvor man gjør NDF og ADF på samme posen. Man må da askekorrigere både NDF og ADF resultatet med asken etter ADF.

6. Prøvemateriale

Filterposene er laget slik at de skal klare å holde igjen 95% av partikler større enn 30 µm.

Metoden kan benyttes på de fleste typer prøver, men for å være garantert gode resultater anbefaler produsenten at partikkelstørrelsen ikke må være mindre enn 1 mm

F57 brukes til vanlig malte prøver. F58 brukes ved mindre partikler, eks: in sacco, gjødsel, mel og lignende.

Prøvene skal være romtemperert.

7. Arbeidsbeskrivelse

Innveiging av prøver

1. Merk filterposen med prøvens nummer. (Permanent marker svart).
2. Vei filterposene og registrer vekta (W_0).
3. Tarer ut posen og vei 0,45-0,5g prøve i filterposen. (Sørg for at det ikke er prøvepartikler i forseglingsområdet).
4. Registrer prøvevekta (W_1).
5. Forsegl filterposen ca. 4mm fra åpningen. Hold forseglar-armen nede 2-3 sek etter at det røde lyset har slukket for å avkjøle forseglingen.
6. Rist og fordel prøven i posen for å forhindre at prøven klumper seg.

Avfetting

Dersom prøvene inneholder soyabønneprodukter eller overstiger 5% fett, skal prøvene avfettes på følgende måte:

1. Legg prøvene i et glass med lokk.
2. Fyll opp glasset med aceton så det dekker prøvene.
3. Sett på lokket.
4. Rist glasset 10 ganger og la det stå i 10 minutter.
5. Tøm ut acetonet.
6. Gjenta pkt 1-5 én gang til.
7. La prøvene lufttørke.

Dersom prøvene inneholder *ristede* soyabønner skal prøvene avfettes på følgende måte:
Pkt 1-3 følges likt fra forrige avfettingsprosedyre.

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Michel Brunet Berg	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 03.2013	Revisjon 03.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn 1042_SOP_aN DFom_ENG	Side: 3/6

4. Rist glasset 10 ganger.
5. Tøm ut acetonet.
6. Fyll glasset med ny aceton og la prøvene ligge i 12 timer.
7. Tøm ut acetonet.
8. La prøvene lufttørke.

Fyll poseholderen

Poseholderen består av 9 brett med plass til 3 poser pr. brett. Plasser de lufttørkede posene i brettene. De 3 første plasseres i utdypningene på det første brettet. De neste 3 plasseres i brett nr 2 osv. Brettene roteres 120° i forhold til hverandre. Brett nr 9, det øverste brettet, skal være tomt. Dette fungerer som et lokk for de 8 andre brettene.

Prosedyre på Ankom

NB! Kammeret må ha romtemperatur før analysen kan settes i gang.

1. Skru på Ankom.
2. Plasser poseholderen i kammeret.
3. Sett topploddet på plass.
4. Tilsett 20g Natriumsulfit (Sodium sulfite), 4ml α -amylase og maks 2.0 liter NDF-løsning.
5. Trykk inn **HEAT** og **AGITATE**- knappene. Se i kammeret at prøveholderen er i bevegelse.
6. Lukk igjen lokket.
7. La det stå i 75 minutter.
8. Slå av **HEAT** og **AGITATE**.
9. **NB!!! ÅPNE AVLØPSKRANA OG TØM KAMMERET FOR LØSNING OG FOR Å FJERNE OVERTRYKKET.**
10. Åpne lokket til kammeret.
11. Lukk avløpskranen.

Skylling:

1. Tilsett 4ml α -amylase og 1,9-2,0 liter 70-90°C vann.
OBS: Dersom **HEAT**-knappen ikke slås på kan lokket stå åpent under rensing. Skru du den på **må** lokket igjen. (Valgfritt).
2. Trykk inn **AGITATE**-knappen og la det stå 5 minutter.
3. Åpne avløpskrana sakte og la rensenvannet tømmes.

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Michel Brunet Berg	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 03.2013	Revisjon 03.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn 1042_SOP_aN DFom_ENG	Side: 4/6

4. Gjenta pkt. 1-3 for 2. vask.
5. Gjenta pkt. 1-3 **uten** α -amylase for 3.vask.

Videre prosedyre:

1. Åpne lokket og ta ut poseholderen.
2. Legg prøvene i et 250ml begerglass.
3. Press forsiktig med hånden ut overflødig vann og tøm begerglasset for vannet
4. Tilsett aceton nok til å dekke prøvene og la prøvene ligge i 3-5 minutter.
5. Hell ut acetonet.
6. Press forsiktig med hånden ut overflødig aceton og tøm begerglasset.
7. La posene lufttørke til de er helt fri for aceton.
8. Legg posene i tørkeskap ved 102°C (\pm 2°C) i 2-4 timer.
9. Legg posene direkte i Desiccant Pouch zip poser.
10. Flat ut zip posen så mye som mulig for å fjerne så mye luft som mulig.
11. La prøvene avkjøles til romtemperatur. (Ca.10-15min).
12. Vei av prøvene og registrer vekta (W_2).

Foraskning

1. Merk telleglasset med prøvens nummer
2. Vei telleglasset og noter vekta (W_3)
3. Legg posen oppi telleglasset og sett prøven(e) i foraskningsovnen

***NB! Nummereringen forsvinner under foraskningen.
Merk deg derfor hvordan du plasserer prøvene.***

4. Sjekk at foraskningsovnen er stilt inn på riktig temperatur (550 °C) og start oppvarmingen. La prøvene stå til foraskning i min. 4 timer, maks 20 timer
5. La de avkjøles litt i romtemperatur.
6. Foraskede prøver settes i eksikator (med aktivt tørkemiddel) til avkjøling.
7. Når temperaturen på prøvene er blitt stabil (romtemperatur) veies prøvene (W_4).

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Michel Brunet Berg	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 03.2013	Revisjon 03.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn 1042_SOP_aN DFom_ENG	Side: 5/6

8. Utregning

$$\left(\frac{(W_2 - W_0) \times F - (W_4 - W_3)}{W_1} \right) \times 1000 \text{ g/kg} = \text{mengde aNDFom i prøven (g/kg)}$$

W₀ = vekt av pose (g) - posevekt

W₁ = vekt av innveid prøve (g)

W₂ = vekt av prøve + pose etter tørking (g) - tørrvekt

W₃ = telleglass (g)

W₄ = vekt av forasket prøve + telleglass (g)

F = posekorrigeringsfaktor = 0,9987 (F57 poser)

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Michel Brunet Berg	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 03.2013	Revisjon 03.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn 1042_SOP_aN DFom_ENG	Side: 6/6