

Stofnaam	Fytase
Type methode	
Te onderzoeken in	enzymconcentraten, premixen en/of voormengsels als eindproducten (voeders)
Minimum bepaalbaarheidsgrens	0,012 FTU/ml
Herhaalbaarheid	5,4% bij 21536*E3 FTU/kg 4,7% bij 5563*E3 FTU/kg 6,8% bij 369 FTU/kg
Reproduceerbaarheid	8,0% bij 21536*E3 FTU/kg 11,8% bij 5563*E3 FTU/kg 12,2% bij 369 FTU/kg
Aantoonbaarheid	0,006 FTU/ml
Categorie	
Titel	Bepaling van de fytase-activiteit IAV nr. BC012; Uitgiftedatum 15-04-96; Editie nr 2; CCL, Veghel. (Afgeleid van voorschriften, die beschikbaar zijn gesteld door Gist-brocades)

## **1 Doel en toepassingsgebied**

Fytase-activiteit maakt anorganisch fosfaat vrij uit fytaat. Omdat éénmagigen geen beschikking hebben over fytase-activiteit wordt fytase aan het voeder toegevoegd om fosfaat beschikbaar te maken uit fytaat. De methode is bestemd om in zowel enzympreparaten, premixen en/of voormengsels als eindproducten (voeders) de fytase-activiteit te bepalen, dit ter controle van de verwerking van de enzympreparaten in het voeder.

### **1.1 Aantoonbaarheidsgrens**

De aantoonbaarheidsgrens van de methode bedraagt 0,006 FTU/ml

### **1.2 Bepaalbaarheidsgrens**

De bepaalbaarheidsgrens van de methode bedraagt 0,012 FTU/ml

## **2 Definitie**

De fytase-activiteit wordt weergegeven in FTU/kg, waarbij FTU gedefinieerd wordt als de hoeveelheid enzym welke per minuut  $1\mu\text{mol}$  anorganisch fosfaat vrijmaakt uit  $5,1\text{ mmol/l}$  natriumfytaat bij  $37,0\text{ °C}$  en pH 5,50.

## **3 Beginsel**

Fytase-activiteit werkt onder standaardomstandigheden in op natriumfytaat, waarbij anorganisch fosfaat vrijkomt. Na incubatie wordt de reactie gestopt door toevoeging van zuur vanadaat-molybdaatreagens. Het fosfaat vormt met dit reagens het geel gekleurde vanadomolybdofosforkomplex. De optische dichtheid van het complex wordt gemeten bij 415 nm en is een maat voor de hoeveelheid fosfaat.

## **4 Precisie**

Zie validatiegegevens.

## **5 Veiligheid**

Bij het uitvoeren van deze methode dienen de normale laboratoriumvoorschriften met betrekking tot de veiligheid in acht te worden genomen. Extra voorzorg dient er genomen te worden bij het werken met geconcentreerde zuren.

## **6 Chemicaliën en reagentia**

Met "water" wordt bedoeld, water gereinigd over een milli-Q-installatie met een minimale weerstand van 10 megaohm per cm of water van vergelijkbare kwaliteit.

### **6.1 Chemicaliën**

Chemicaliën van andere fabrikanten dan hieronder genoemd zijn, mogen gebruikt

worden mits ze dezelfde specificaties bezitten.

- 6.1.1 Azijnzuur 100%; Merck art. 0063
- 6.1.2 Natriumacetaat.trihydraat; Merck art. 6267
- 6.1.3 Calciumchloride.dihydraat; Merck art. 2382
- 6.1.4 Natriumfytaat from corn; Sigma cat.nr. P-8810
- 6.1.5 Salpeterzuur; Merck art. 0456
- 6.1.6 Ammoniumheptamolybdaat.tetrahydraat; Merck art. 1182
- 6.1.7 Ammoniummonovanadaat; Merck art. 1226
- 6.1.8 Ammonia 32%; Merck art. 0829
- 6.1.9 Kaliumdihydrogeenfosfaat; Merck art. 1.05108
- 6.1.10 Fytase concentraat; hoog geconcentreerde fytase-preparaat met een officieel toegekende activiteit; ex. Gist-brocades
- 6.1.11 Tarwezemelen; gemalen op 1,0 mm waarna getoast gedurende 20 minuten bij 135 °C
- 6.1.12 Tween 20; Merck art. 822184

## 6.2 Reagentia

- 6.2.1 Acetaatbuffer, 0,25 mol/l, pH 5,50; los 8,80 g azijnzuur (6.1.1), 150,1 g natriumacetaat (6.1.2) en 0,735 g calciumchloride (6.1.3) op in ca. 4500 ml water in een 5000 ml maatkolf. Vul aan tot 5000 ml met water en controleer de pH, welke moet liggen tussen 5,45 en 5,55.
- 6.2.2 Acetaatbuffer, 0,25 mol/l, pH 5,50; los 8,80 g azijnzuur (6.1.1), 150,1 g natriumacetaat (6.1.2) en 0,735 g calciumchloride (6.1.3) op in ca. 4500 ml water in een 5000 ml maatkolf. Voeg 5,00 ml Tween 20-oplossing (6.2.9) toe en vul aan tot 5000 ml met water en controleer de pH, welke moet liggen tussen 5,45 en 5,55.
- 6.2.3 Voederbuffer, 0,25 mol/l, pH 5,50; los 150,1 g natriumacetaat (6.1.2) en 50,75 g calciumchloride (6.1.3) op in ca. 4500 ml water in een 5000 ml maatkolf. Breng de pH op  $5,50 \pm 0,05$  met azijnzuur (6.1.1).
- 6.2.4 Natriumfytaat-oplossing, 8,40 g/l; los 4,20 g natriumfytaat (6.1.4) op in 400 ml acetaatbuffer (6.2.1) in een 600 ml bekersglas. Breng de pH met azijnzuur (6.1.1) op  $5,50 \pm 0,03$ . Spoel over in een 500 ml maatkolf en vul aan tot de maatstreep met acetaatbuffer (6.2.1).  
Bereid deze oplossing iedere dag vers.

- 6.2.5 Salpeterzuur verdund; voeg langzaam en onder voortdurend roeren 70 ml salpeterzuur (5.1.5) toe aan 130 ml water (zie § 7).
- 6.2.6 Ammoniumheptamolybdaat-oplossing, 100 g/l; los 100 g ammoniumheptamolybdaat (6.1.6) op in ca. 900 ml water in een maatkolf van 1000 ml. Voeg 7,8 ml ammonia (6.1.8) toe, vul aan tot maatstreep met water en meng.  
Deze oplossing is 3 maanden houdbaar bij kamertemperatuur in het donker.
- 6.2.7 Ammoniummonovanadaat-oplossing, 2,35 g/l; los 2,35 g ammoniummonovanadaat (6.1.7) volledig op in ca. 400 ml water van ca. 60 °C in een maatkolf van 1000 ml. Voeg langzaam en onder voortdurend roeren 20 ml verdund salpeterzuur (6.2.5) toe en koel af tot kamertemperatuur. Vul aan tot de maatstreep met water en meng.  
Deze oplossing is 3 maanden houdbaar bij kamertemperatuur in het donker.
- 6.2.8 Kleur/stopreagens; breng achtereenvolgens in een maatkolf van 500 ml, 125 ml ammoniummolybdaat-oplossing (6.2.6) en 125 ml ammonium-monovanadaat-oplossing (6.2.7). Voeg langzaam en onder voortdurend roeren 82,5 ml salpeterzuur (6.1.5) toe (zie § 7), koel af tot kamertemperatuur en vul aan tot maatstreep met water en meng.  
Maak deze oplossing dagelijks vers.
- 6.2.9 Tween 20-oplossing; los 10 g Tween 20 (6.1.12) op in ca. 80 ml water in een 100 ml maatkolf. Vul aan met water en meng.  
Deze oplossing is 6 maanden houdbaar bij omgevingstemperatuur.

## **7 Apparatuur, hulpmiddelen en glaswerk**

### **7.1 Apparatuur**

- 7.1.1 Analytische balans; Mettler AE 200
- 7.1.2 Bovenweger; Mettler PE 360
- 7.1.3 Magneetroerder; Janke en Kunkel, IKAMAG RCT
- 7.1.4 Vortex; Janke en Kunkel, VIBROFIX VF1
- 7.1.5 pH-meter; Radiometer PHM 82
- 7.1.6 Waterbad; Grant SE-20
- 7.1.7 Spektrofotometer; Pharmacia LKB, Biochrom 4060
- 7.1.8 Centrifuge; Jouan CR 312
- 7.1.9 Schudmachine; Edmund Bühler SM25
- 7.1.10 Dilutor; Hamilton Microlab 1000 plus

## 7.2 Hulpmiddelen

- 7.2.1 Verstelbare pipetten; 5000 µl Gilson Pipetman
- 7.2.2 Dispenser ingesteld op 4,00 ml; Fortuna Optifix
- 7.2.3 Dispenser ingesteld op 50,0 ml; Fortuna Optifix
- 7.2.4 Dispenser ingesteld op 100,0 ml; Fortuna Optifix
- 7.2.5 Vouwfilter; Schleicher en Scheull 595½

## 7.3 Glaswerk

- 7.3.1 Kuvet; Hellma 10,00 mm glas
- 7.3.2 Monsterpot; glas met schroefdeksel 100 ml
- 7.3.3 Monsterpot; glas met schroefdeksel 200 ml
- 7.3.4 Glazen reageerbuizen, ca. 12 ml.

## 8 Werkwijze

### 8.1 Algemeen

De bepaling van de fytase-activiteit wordt in tweevoud uitgevoerd. Per analyseserie wordt minimaal één controle monster meegenomen. Naast de kaliumdihydrogeenfosfaat (6.1.9) standaard wordt het fytase-concentraat (6.1.10) als controlemonster meegenomen in de bepalingen.

### 8.2 Voorbehandeling van het monster

De aangeleverde monsters en controle monsters worden bij 4° C opgeslagen. Het fytase-concentraat (6.1.10) wordt bij -18° C bewaard. Voor bepaling wordt een representatief deel van het aangeleverde monster op 0,5 mm gemalen. Enzympreparaten worden niet gemalen.

### 8.3 Extractieprocedure

Bij de extractieprocedure wordt onderscheid gemaakt tussen enzymconcentraten, premixen, voormengsels en voeders.

#### Enzympreparaten:

Weeg in tweevoud 2,0 g op 0,1 mg nauwkeurig enzympreparaat af in een 100 ml glazen monsterpot (7.3.2). Voeg 50,0 ml acetaatbuffer (7.2.2) toe m.b.v. dispenser (7.2.2). Extraheer gedurende 60 minuten op schudmachine (7.1.9) bij maximale stand. Filtreer het verkregen extract over vouwfilter (7.2.4) tot ca. 10 ml filtraat opgevangen is. Meng en verdun dit filtraat volgens aangegeven verdunningsschema naar gelang fytase-activiteit

opgegeven is.

Premixen:

Weeg in tweevoud 2,0 g op 0,1 mg nauwkeurig premix af in een 200 ml glazen monsterpot (7.3.3) en voeg 10,0 g tapioca (6.1.11) toe en meng. Voeg 100,0 ml koude (4 °C) acetaatbuffer (6.2.2) toe m.b.v. dispenser (7.2.4) aan het mengsel. Extraheer gedurende 60 minuten op schudmachine (7.1.9) bij maximale stand. Filtreer het verkregen extract over vouwfilter (7.2.5) tot ca. 10 ml filtraat opgevangen is. Meng en verdun dit filtraat volgens aangegeven verdunningsschema (§ 8.5) naar gelang fytase-activiteit gedoseerd is.

Voormengsel:

Weeg in tweevoud op 2,0 g op 0,1 mg nauwkeurig voormengsel af in een 100 ml glazen monsterpot (7.3.2). Voeg 50,0 ml acetaatbuffer (6.2.2) toe m.b.v. dispenser (7.2.3). Extraheer gedurende 60 minuten op schudmachine (7.1.9) bij maximale stand. Filtreer het verkregen extract over vouwfilter (7.2.5) tot ca. 10 ml filtraat opgevangen is. Meng en verdun dit filtraat volgens verdunningsschema (§ 8.5) naar gelang fytase-activiteit gedoseerd is.

Voeders:

Weeg in tweevoud op 10,0 g op 1 mg nauwkeurig voeder af in een 200 ml glazen monsterpot (7.3.3). Voeg 100,0 ml voederbuffer (6.2.3) toe m.b.v. dispenser (7.2.4). Extraheer gedurende 60 minuten op schudmachine (7.1.9) bij maximale stand. Filtreer het verkregen extract over vouwfilter (7.2.5) tot ca. 10 ml filtraat opgevangen is. Meng en verdun dit filtraat volgens verdunningsschema (§ 8.5) naar gelang fytase-activiteit gedoseerd is.

8.4 Calibratiecurve

Weeg in tweevoud 0,75 g op 0,1 mg nauwkeurig kaliumdihydrogeenfosfaat (6.1.9) af in een 100 ml maatkolf. Voeg ± 90 ml acetaatbuffer (6.2.1) toe en schud gedurende 20 minuten m.b.v. schudmachine (7.1.9) bij maximale stand. Vul aan tot de maatstreep en maak met deze oplossingen kalibratiecurves volgens onderstaand schema. Voer de verdunningen uit met acetaatbuffer (6.2.1) en neem deze buffer als blanco voor deze kalibratiecurves.

	eerste stap	tweede stap
fosfaat-standaard 100 ml	1,000 + 9,000	1,000 + 1,000
	0,769 + 9,230	1,000 + 1,000
	0,500 + 9.500	1,000 + 1,000
	0,250 + 9.750	1,000 + 1,000
	0,123 + 9,870	1,000 + 1,000

Weeg van het fytase-concentraat (6.1.10) met gedeclareerde activiteit in tweevoud 0,40 g op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf. Voeg ± 90 ml acetaatbuffer (6.2.2) toe en schud gedurende 20 minuten m.b.v. schudmachine (7.1.9) bij maximale stand. Vul aan tot de maatstreep en maak met deze oplossingen kalibratiecurves volgens onderstaand schema. Voer de verdunningen uit met acetaatbuffer (6.2.2) m.u.v. de laatste verdunningsstap welke met acetaatbuffer (6.3.1) wordt uitgevoerd. Neem 0,20 ml acetaatbuffer (6.2.2) als blanco voor deze kalibratiecurve.

eerste stap                      tweede stap                      derde stap

fytase-standaard 100 ml	0,250 + 9,750	1,000 + 9,000	0,200 + 1,800
	0,250 + 9,750	0,666 + 9,330	0,200 + 1,800
	0,250 + 9,750	0,400 + 9,600	0,200 + 1,800
	0,250 + 9,750	0,200 + 9,800	0,200 + 1,800
	0,250 + 9,750	0,100 + 9,900	0,200 + 1,800

## 8.5 Verdunningsschema's

Alle verdunningen worden uitgevoerd met acetaatbuffer (6.2.2) m.u.v. de laatste verdunning welke in tweevoud wordt uitgevoerd (blanco- en enzymbepaling) met acetaatbuffer (6.2.1) in glazen reageerbuisen (7.3.4). Na toevoegen van acetaatbuffer eerst goed mengen alvorens door te verdunnen.

Fytase-activiteit (FTU/kg)	eerste stap	tweede stap	derde stap	verd.factor
enzympreparaten:				
6.500.000	0,200 + 4,800	0,125 + 4,875	0,200 + 1,800	250.000
2.500.00	0,250 + 4,750	0,250 + 4,750	0,200 + 1,800	100.000
premixen:				
200.000 - 100.000	0,400 + 4,600	0,200 + 1,800		6.250
100.000 - 10.000	0,800 + 4,200	0,200 + 1,800		3.125
voormengsel:				
100.000 - 10.000	0,500 + 4,500	0,200 + 1,800		2.500
Voeders:				
2.000 - 1.000	0,500 + 1,500			200
1.000 - 0	1,000 + 1,000			100

De eindverdunningen dienen een fytase-activiteit te bevatten die ligt tussen 0,010-0,100 FTU/2ml.

## 8.6 Activiteitsbepaling

### Enzymbepaling

Plaats op tijdstip  $t=0$  min (stopwatch) op volgorde van de serie en met regelmatige tijdsintervallen (10 sec) de enzymbepaling-buizen in het waterbad van  $37,0 \pm 0,1$  °C en laat equilibreren. Voeg met behulp van een dispenser (7.2.2) op tijdstip  $t=10$  min in dezelfde volgorde en met dezelfde regelmatige tijdsintervallen 4,00 ml natriumfytatopl. (6.2.4) van  $37,0 \pm 0,1$  °C toe, meng en plaats terug in het waterbad. Stop op tijdstip  $t=70$  min de reactie door in dezelfde volgorde en met dezelfde tijdsintervallen met behulp van een verstelbare pipet (7.2.1) aan de buizen 4,00 ml kleur/stopreagens (6.2.8) toe te voegen en meng.

### Blancobepaling

Plaats op tijdstip  $t=0$  min (stopwatch) op volgorde van de serie en met regelmatige tijdsintervallen (10 sec) de blancobepaling-buizen in het waterbad van  $37,0 \pm 0,1$  °C en laat equilibreren. Voeg met behulp van een verstelbare pipet (7.2.1) op tijdstip  $t=10$  min in dezelfde volgorde en met dezelfde tijdsintervallen 4,00 ml kleur/stopreagens (6.2.8) toe, meng en plaats de buizen uit het waterbad. Voeg vervolgens met behulp van een

dispenser (7.2.2) aan alle monsterblanco's 4,00 natriumfytatopl. (6.2.4) van  $37,0 \pm 0,1^\circ$  C toe en meng.

#### Calibratiecurve

Ga voor de fosfaat-standaard hetzelfde te werk als bij de blankobepaling.

Ga voor het fytase-concentraat hetzelfde te werk als bij de enzymbepaling.

Centrifugeer enzymbepaling- en blankobepaling-buizen gedurende 5 minuten bij 3000 rpm. Meet de extinctie van de gekleurde oplossingen bij 415 nm, waarbij de spektrofotometer met water op 0,000 extinctie wordt ingesteld.

## 9 Berekening

Corrigeer alle gemeten extincties voor de bijbehorende blanco-bepalingen. Zet grafisch een calibratielijntje uit extinctie gemeten bij 415 nm tegen fytase-activiteit (FTU/2ml). Bereken vanuit de fosfaatstandaard.

Bereken m.b.v. rekenmachine (lineaire regressie) de bijbehorende calibratielijntje. Vul de verkregen extinctieveranderingen in deze lijntje in en bereken de bijbehorende fytase-activiteit x FTU/2ml.

De fytase-activiteit in het monster wordt berekend met de volgende formule:

$$\text{fytase-act. (FTU/kg)} = \frac{x * f}{m} * 1000$$

waarbij: x = FTU/2ml berekend uit de calibratielijntje

f = verdunningsfactor

m = inweeg monster (gram)

De uiteindelijke fytase-activiteit is het gemiddelde van de tweevoudige bepaling. Enzympreparaten worden weergegeven met een  $10E3$  factor en afgerond op hele duizendtallen. Premix en voormengsel worden afgerond op hele honderdtallen en voeders worden afgerond op gehele getallen.

## 10 Beoordeling

Gemeten extinctieveranderingen mogen niet groter zijn dan de grootste extinctieverandering van de calibratiecurve.

Gemeten extinctieveranderingen moeten groter zijn dan 10% van de grootste extinctieverandering van de calibratiecurve.

Duplospreiding bij enzympreparaten, premixen en voormengsels mag niet groter zijn dan 5,0%. Duplospreiding bij voeders mag niet groter zijn dan 10,0%.

Controlemonsters moeten voldoen aan de richtlijnen die opgegeven zijn in bijlage 8.6 van het kwaliteitshandboek.

## 11 Literatuur

11.1 Fytase-activiteit, manuele vanadaat methode 61696 4C 2832.00 ex. Gist-brocades.