

Lab. Akkerbouw

1981-02-20

Verslag 81.22

Pr.nr. 14.427

Onderwerp: Bepaling van het gehalte aan  
enzymatisch aantastbaar zet-  
meel in zetmeelrijke diervoed-  
dergrondstoffen.

Voorgaande verslag(en): 80.73 en 81.06.



Project: Normalisatie/harmonisatie analysemethoden voor diervoeders en grondstoffen (ISO/EEG)

Onderwerp: Bepaling van het gehalte aan enzymatisch aantastbaar zetmeel in zetmeelrijke diervoedergrondstoffen.

Bijlage: I en II

Voorgaande verslag(en): 80.73 en 81.06

---

Doel:

Onderzoek naar de inwerking van pancreatine op ontsloten en natief maismeel volgens concept ontwerp analysemethode van de Normalisatie werkgroep 370.10.005 voor de bepaling van "vitro verteerbaar ruw zetmeel".

Samenvatting:

De inwerking van pancreatine werd bekeken bij drie verschillende incubatietijden namelijk 30 - 45 - 60 min.

Conclusie:

De methodebeschrijving is, afgezien van enkele voorstellen tot verbetering, goed bruikbaar. De herhaalbaarheid bij de voorgestelde 30 minuten incuberen noodt tot afronden van de vitro verteringscoëfficiënt op gehele getallen. Het verschil tussen het ontsloten produkt en het oorspronkelijke produkt is goed aantoonbaar.

---

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse

Medewerker/Samensteller: M.L. Essers.

*ME.*

### Inleiding:

Dit onderzoek werd opgezet naar aanleiding van de resultaten vermeld in verslag 81.06. In het onderhavige onderzoek werd de inwerking van 400 mg pancreatine op natief en ontsloten maïsmeel nagegaan.

### Materiaal:

Natief en ontsloten maïsmeel afkomstig van Granaria (januari 1981).  
Pancreatine van Merck nr. 7133.

### Methoden:

De monsters werden geanalyseerd volgens bijlage I. Wijziging: er werd ook geïncubeerd bij 45 en 60 min. De enzymsterkte werd bepaald volgens bijlage II.

### Resultaten:

	% Totaal zetmeel op de waar	Vocht %	Incubatietijd min.	Vitro verterings- coefficient %
ontsloten maïsmeel	60,4	12,7	30	98,0/97,6
			45	95,4
			60	96,1
natief maïsmeel	60,4	12,1	30	42,7/41,9/38,4
			45	50,9
			60	61,8

De  $\alpha$ -amylase aktiviteit van de pancreatine was 39,7 E/mg.

### Bespreking van de resultaten:

1 Daar na dosering van de voorverwarmde buffer, maïsmeel boven in de maatkolf bleef kleven, was de zetmeelomzetting niet optimaal. Hierdoor werd bij ontsloten maïsmeel na 60 min. incubatie minder gevonden dan na 30 min.

Om dit tegen te gaan zou men na dosering van de buffer de wand af moeten spoelen met water van 40°C. Het voorschrift voorziet hier niet in.

- 2 Gezien de lage verbruiken van de thio (+ 3 ml) bij natief maismeel is het beter om bij verwachte lage concentraties aan vitro verteerbaar ruw zetmeel voor de titratie meer te inverteren dan de voorgeschreven 25 ml.
- 3 Daar bij enzymsterkte bepaling in het filtraat na de incubatie weinig of geen zetmeel meer aanwezig was, zal voor de aktiviteitsbepaling een andere verhouding enzym - zetmeel genomen moeten worden.

Verzendlijst: Van Doesburgh, adj. directeur, sektorhoofden (3x),  
Dir. V.K.A., afdeling Akkerbouw, leesportefeuille (5x),  
Normalisatie, Projectbeheer.

Es/W

Ontwerp methode van de Ned. Normalisatie werkgroep "Koolhydraten in diervoeders" W.G. 370.10.005.

BEPALING VAN DE IN VITRO VERTEERBAARHEID VAN RUW ZETMEEL

1. Onderwerp

Deze norm beschrijft een methode voor de bepaling van het gehalte aan in vitro verteerbare ruwe zetmeel in diervoeders en in plantaardige diervoedergrondstoffen.

2. Toepassingsgebied

Deze norm is van toepassing bij het onderzoek van enkelvoudige en samengestelde voeders voor dieren.

3. Definitie

Gehalte aan in vitro-verteerbare ruwe zetmeel: de hoeveelheid zetmeel en hoogmoleculaire afbraakprodukten hiervan die - zonder voorbewerking - door  $\alpha$ -amylase afgebroken kan worden, plus de reducerende suikers, bepaald als glukose en omgerekend tot zetmeel, uitgedrukt in procenten van het in behandeling genomen monster.

Een alternatieve definitie, die minder zeggend is, zou kunnen luiden: Gehalte aan in vitro-verteerbare ruwe zetmeel: de hoeveelheid glukoseequivalenten, vermenigvuldigd met 0,9, zoals bepaald in de hieronder beschreven methode en uitgedrukt in procenten van het in behandeling genomen monster.

4. Beginsel

Het monster wordt geïncubeerd met het enzympreparaat pancreatine. Het daarin aanwezige enzym amylase breekt zetmeel af tot wateroplosbare maltose en dextrinen. Na onteiwitting met Carrez-oplossingen worden maltose en dextrinen gehydrolyseerd door koken met zoutzuur en het gevormde glukose bepaald volgens de methode Luff-Schoorl.

Dezelfde bepaling, maar dan na ontsluiting van alle zetmeel onder druk, wordt toegepast voor totaal zetmeel. Totaal zetmeel wordt bepaald volgens NEN 3574, zonder extractie van in ethanol 40% (v/v) oplosbare suikers.

5. Bereid het analysemonster overeenkomstig de richtlijnen vermeld in NEN 3328.

Vermijd warmte-ontwikkeling tijdens het malen zoveel mogelijk.

6. Reagentia en hulpstoffen

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn. Gebruik gedestilleerd water of water van tenminste gelijke zuiverheid.

- 6.1 Pancreatine (pancreaspoeder type C Diosynth of Merck nr. 7133).

- 6.1.1 Bepaling van de aktiviteit van pancreatine (zie pag. 4).

- 6.2 Buffer/zoutoplossing, pH 6,8. Los daartoe 3,631 g kaliumdiwaterstoffosfaat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 4,750 g dinatriumwaterstoffosfaat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 0,934 g NaCl op in 1 l water.

- 6.3 Klaringsoplossingen volgens Carrez.

- 6.3.1 Carrez-I: Los 21,9 g zinkacetaat ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 3 g ijsa-  
zijn op in water en vul aan tot 100 ml.

- 6.3.2 Carrez-II: Los 10,6 g kaliumhexacyanoferraat (II)  
( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) op in water en vul aan tot 100 ml.

- 6.4 NaOH 4 m en 10 m.

- 6.5 HCL ca. 8 m en 4 m.

- 6.6 Fenolftaleïne-indicator.

7. Toestellen en hulpmiddelen

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en hulpmiddelen en in het bijzonder:

- balans met een nauwkeurigheid van 1 mg.
- schudwaterbad of een waterbad in combinatie met een magnetisch roerapparaat.
- autoclaaf of hogedrukpan voor verhitting tot tenminste 120°C.

8. Uitvoering

- 8.1 Laat de buffer/zoutoplossing in een waterbad van 40°C  $\pm$  1°C in ca. 20 min. op temperatuur komen.

Weeg af 1,0 g van het monster op 1 mg nauwkeurig en 400 mg pancreatine in een maatkolf van 250 ml. Voeg hieraan 50 ml van de voorverwarmde buffer/zoutoplossing toe.

Incubeer het mengsel in het waterbad onder voortdurende beweging gedurende 30 minuten, gerekend vanaf het moment van toevoeging van de buffer/zoutoplossing. Breng de kolf over in een koud waterbad en voeg onmiddellijk 5 ml Carrez-I-oplossing toe. Schud krachtig gedurende 1 minuut en voeg daarna 5 ml Carrez-II-oplossing toe. Schud weer 1 minuut. Laat de oplossing verder afkoelen. Neutraliseer met 4 m NaOH op fenolftaleïne tot licht-rose. Voeg druppelsgewijs 8 m HCl-oplossing toe tot kleuromslag en dan nog 2 druppels extra. Vul de maatkolf met water aan tot de maatstreep en homogeniseer de inhoud. Filtreer door een vouwfilter. Verwerp het eerste deel van het filtraat en pipetteer vervolgens uit het heldere filtraat 25 ml in een erlenmeyer van 100 ml. Voeg 3 ml 8 m HCl-oplossing toe en kook gedurende 1½ uur aan een terugvloeiakoeler. Laat de oplossing afkoelen, neutraliseer met 10 m NaOH tot licht-rose en vervolgens met 4 m HCl tot kleurloos.

Spoel de inhoud van de erlenmeyer kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml en vul met water aan tot de maatstreep. Homogeniseer en bepaal de hoeveelheid glukose volgens Luff-Schoorl zoals beschreven in NEN 3574. Voer een blanco bepaling uit door aan 400 mg pancreatine 50 ml voorverwarmde buffer/zoutoplossing toe te voegen en verder te werken volgens bovenbeschreven wijze.

#### 9. Berekening

Bereken het gehalte aan in vitro verteerbaar ruw zetmeel uit:

$$W = \frac{0,9 (a-b) 10 \cdot 10^2 \cdot 10^2}{V.m. 10^3}$$

waarin: W is het gehalte aan in vitro verteerbaar ruw zetmeel,

in % (m/m);

a en b is respectievelijk de afgelezen hoeveelheden glukose uit de tabel voor de bepaling en de blanco;

m is afgewogen hoeveelheid analysemateriaal, in g;

V is het voor de titratie gepipetteerde volume, in ml.



Bereken op dezelfde wijze het gehalte aan totaal zetmeel, waarbij dezelfde blanco waarde gebruikt kan worden.

Als A het gehalte in vitro verteerbaar zetmeel en B dat aan totaal zetmeel is, dan is  $\frac{A}{B} \times 100$  de in vitro verteringscoëfficiënt.

#### 6.1.1 Bepaling van de activiteit van pancreatine.

##### a. Definitie van de activiteit.

Een eenheid pancreatine is die hoeveelheid enzymmengsel, die bij de proefomstandigheden (temp. 40°C, pH 6,8) gemiddeld per minuut 1  $\mu$ mol maltose-equivalenten uit zetmeel volgens Zulkowski vrijmaakt, gemeten over 30 minuten.

##### b. Uitvoering

Pipetteer in een maatkolf van 250 ml 10 ml zetmeel-oplossing (30 g per l) en 50 ml voorverwarmde buffer/zoutoplossing. Incubeer het mengsel in het waterbad onder voortdurende beweging gedurende 30 minuten, gerekend vanaf het moment van toevoeging van de buffer/zoutoplossing. Breng de kolf over in een koud waterbad en voeg onmiddellijk 5 ml Carrez-I-oplossing toe. Schud krachtig gedurende 1 minuut en voeg daarna 5 ml Carrez-II-oplossing toe. Schud weer 1 minuut. Laat de oplossing verder afkoelen. Neutraliseer met 4 m NaOH op fenolftaleïne tot licht-rose. Voeg druppelsgewijs 8 m HCl-oplossing toe tot kleuromslag. Vul de maatkolf met water aan tot de maatstreep en homogeniseer de inhoud. Filtreer door een vouwfilter. Verwerp het eerste deel van het filtraat en pipetteer vervolgens uit het heldere filtraat 25 ml in een maatkolf van 100 ml en vul met water aan tot de maatstreep. Homogeniseer en bepaal de hoeveelheid maltose volgens Luff-Schoorl, zoals beschreven in NEN 3754. Voer gelijktijdig een blanco-bepaling uit met geïnactiveerd enzym (enzymmengsel 10 minuten op 100°C verhitten). Het zetmeel volgens Zulkowski kan reducerende bestanddelen bevatten.

## Bijlage II

### Bepaling $\alpha$ -amylase aktiviteit van pancreatine.

Hiertoe werd 10 ml 3% zetmeeloplossing en 50 ml buffer ca. 20 min. voorverwarmd in een maatkolf van 100 ml.

Er werd 0,5 ml pancreatine oplossing toegevoegd (150 mg/250 ml buffer), waarna precies 30 min. werd geïncubeerd.

Hierna werd 1 ml Carrez I en 1 ml Carrez II toegevoegd en tegelijk gekoeld. Na aanvullen en affiltreren werd 25,00 ml filtraat volgens NEN 3574 met Luff afgewerkt en afgelezen op de maltose tabel.

Er werd ook een blanco bepaling verricht met geïnactiveerd enzym. Uit het verschil van de bepalingen met actief en inactief enzym werd de aktiviteit berekend.

Definitie:  $\alpha$ -amylase aktiviteit is de hoeveelheid  $\mu$ mol maltose-equivalenten welke per minuut worden vrijgemaakt uit zetmeel volgens Zulkowski, gemeten over 30 minuten onder de proefomstandigheden (temp. 40°C pH 6,8) per mg enzym.