



---

# IN VITRO STUDIE NAAR DE INVLOED VAN INTRINSIEK EN MICROBIEEL FYTASE OP DE AFBRAAK VAN FYTINEZUUR IN BIOLOGISCHE GETEELDE GRONDSTOFFEN VOOR DE DIERHOUDERIJ

Een verkennende studie

L.H. de Jonge, P.G. van Wikselaar, P. Bikker en M.M. van Krimpen



**WAGENINGEN**  
UNIVERSITY & RESEARCH

---



---

# IN VITRO STUDIE NAAR DE INVLOED VAN INTRINSIEK EN MICROBIEEL FYTASE OP DE AFBRAAK VAN FYTINEZUUR IN BIOLOGISCHE GETEELDE GRONDSTOFFEN VOOR DE DIERHOUDERIJ

Een verkennende studie

L.H. de Jonge<sup>1</sup>, P.G. van Wikselaar<sup>2</sup>, P. Bikker<sup>2</sup> en M.M. van Krimpen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Wageningen Universiteit & Research, leerstoelgroep Diervoeding,

<sup>2</sup>Wageningen Livestock Research, afdeling Diervoeding

Dit onderzoek is uitgevoerd als onderdeel van de publiek-private samenwerking (PPS) "Vermindering fosforexcretie door biologisch gehouden varkens en pluimvee – TKI-AF-15105", en is medegefinancierd door het Ministerie van Economische Zaken, in het kader van het Beleidsondersteunend Onderzoek (projectnummer BO-22.04-007-006).

Wageningen Livestock Research

Wageningen, januari 2017

---

Rapport 1006

---

L.H. de Jonge, P.G. van Wikselaar, P. Bikker en M.M. van Krimpen, 2016. *In vitro studie naar de invloed van intrinsiek en microbieel fytase op de afbraak van fytinezuur in biologische geteelde grondstoffen voor de dierhouderij; Een verkennende studie.* Wageningen Livestock Research, Rapport 1006.

In deze studie is de bruikbaarheid van intrinsiek fytase vanuit grondstoffen voor de afbraak van fytinezuur in grondstoffen onderzocht. De enzymatische omzetbaarheid van fytinezuur naar oplosbaar anorganische fosfaat werd in vitro bepaald met en zonder toevoeging microbieel fytase. De afbraak van fytinezuur is gemeten in combinaties van grondstoffen met een hoge intrinsieke fytase activiteit en grondstoffen met een hoog fytinezuurgehalte.

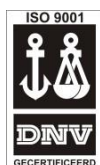
In this study, the usefulness of intrinsic phytase of plant ingredients for degrading phytate was investigated. The enzymatic conversion from phytate to soluble inorganic phosphate was determined in vitro with and without addition of microbial phytase. Phytate degradation was measured in mixtures in which ingredients with a high intrinsic phytase activity and ingredients with a high phytate content were combined.

Dit rapport is gratis te downloaden op <http://dx.doi.org/10.18174/402527> of op [www.wur.nl/livestock-research](http://www.wur.nl/livestock-research) (onder Wageningen Livestock Research publicaties).

© 2016 Wageningen Livestock Research  
Postbus 338, 6700 AH Wageningen, T 0317 48 39 53, E [info.livestockresearch@wur.nl](mailto:info.livestockresearch@wur.nl),  
[www.wur.nl/livestock-research](http://www.wur.nl/livestock-research). Wageningen Livestock Research is onderdeel van Wageningen University & Research.

Wageningen Livestock Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van de uitgever of auteur.



De certificering volgens ISO 9001 door DNV onderstreept ons kwaliteitsniveau. Op als onze onderzoeksopdrachten zijn de Algemene Voorwaarden van de Animal Sciences Group van toepassing. Deze zijn gedeponneerd bij de Arrondissementsrechtbank Zwolle.

Wageningen Livestock Research Rapport

---

# Inhoud

	<b>Woord vooraf</b>	<b>5</b>
	<b>Samenvatting</b>	<b>7</b>
<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>Materiaal en Methode</b>	<b>11</b>
2.1	Materiaal	11
2.2	Methode	11
2.2.1	Karakterisering grondstoffen	11
2.2.2	Enzymatische omzetbaarheid fytinezuur	11
2.2.3	Activiteit <i>fytase</i> in grondstoffen	12
2.2.4	Effectiviteit intrinsiek <i>fytase</i>	12
2.2.5	Pepsine-HCl bestendigheid van intrinsiek <i>fytase</i>	13
<b>3.</b>	<b>Resultaten</b>	<b>14</b>
3.1	Karakterisering grondstoffen	14
3.2	Enzymatische omzetbaarheid fytinezuur	14
3.3	<i>Fytase</i> activiteit in grondstoffen	16
3.4	Effectiviteit intrinsiek <i>fytase</i>	17
3.5	Pepsine-HCl bestendigheid intrinsiek <i>fytase</i>	17
<b>4.</b>	<b>Discussie</b>	<b>19</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusies</b>	<b>20</b>
	<b>Referenties</b>	<b>21</b>
	<b>Bijlage 1 Protocol Enzymatische omzetbaarheid fytinezuur P</b>	<b>22</b>
	<b>Bijlage 2 Protocol: Bepaling van de <i>fytase</i> activiteit</b>	<b>23</b>
	<b>Bijlage 3 Protocol: Bepaling van de effectiviteit van intrinsiek <i>fytase</i></b>	<b>24</b>
	<b>Bijlage 4 Protocol: Pepsine-HCl bestendigheid van intrinsiek <i>fytase</i></b>	<b>25</b>

---

---

# Woord vooraf

In verband met het streven naar evenwichtsbemesting zijn de fosfaatgebruiksnormen de afgelopen jaren geleidelijk verlaagd. Op dit moment is fosfaat de limiterende factor voor de hoeveelheid mest die per hectare aangewend mag worden. Voor de biologische akkerbouwer zijn deze fosfaatgebruiksnormen een groot knelpunt, omdat wanneer de maximale hoeveelheid fosfaat is aangevoerd, er nog steeds ruimte en behoefte is om stikstof aan te voeren, terwijl deze niet als kunstmest mag worden aangevoerd. Voor de biologische varkens- en pluimveehouder is de mestafzet door beperkte plaatsingsruimte van biologische mest binnen Nederland problematisch vanwege o.a. een ongunstige (lage) N/P-verhouding in de mest. De excretie van fosfor (P) via de mest van biologisch gehouden varkens en pluimvee is hoger ten opzichte van mest van gangbaar gehouden dieren. Het hogere P-gehalte hangt samen met het feit dat het enzym fytase niet toegevoegd mag worden aan biologisch voer. In deze studie is nagegaan hoe de werking van planteigen (intrinsiek) fytase in biologische voeders beter benut kan worden, o.a. door grondstoffenkeuze en het productieproces van het voer optimaal af te stemmen op de bescherming van het intrinsiek fytase. In dit project is samengewerkt met producenten van biologisch veevoer en vertegenwoordigers van de biologische varkens- en pluimveehouders. De auteurs bedanken de partners van het project voor hun waardevolle inbreng.

Marinus van Krimpen, projectleider





---

# Samenvatting

Het fosfor in plantaardige grondstoffen is voor een groot deel gebonden aan fytate. Aangenomen wordt dat de meeste eenmagigen (varkens en pluimvee) het enzym fytase missen, wat nodig is om fosfor te splitsen van het fytate. Hierdoor is het fytate-gebonden fosfor in het algemeen voor eenmagigen slecht verteerbaar en opneembaar. In voeders voor de gangbare veehouderij wordt op grote schaal exogeen fytase toegevoegd, waardoor de verteerbaarheid van fosfor sterk toeneemt (van ca. 30 naar 70%). Op deze manier kan het fosforgehalte van het voer omlaag gebracht worden, zonder dat de fosforvoorziening van de dieren en daarmee de gezondheid en dierprestaties in gevaar komt. Commercieel beschikbare producten met (exogeen) fytase worden geproduceerd door genetisch gemodificeerde micro-organismen, waardoor dit enzym niet toegepast mag worden in biologische voeders.

Fytase komt echter ook van nature voor in met name granen en dit intrinsieke fytase kan helpen bij het verhogen van de fosfor verteerbaarheid/opneembaarheid. In deze studie is de bruikbaarheid van intrinsiek fytase vanuit grondstoffen voor de afbraak van fytinezuur in grondstoffen onderzocht. De onderzochte grondstoffen waren voor een belangrijk deel biologisch geteelde grondstoffen voor toepassing in de biologische dierhouderij en bestonden uit DDGS, erwten, gerst, mais, maisglutenvoer, raapzaadschilfers, rogge, sojaschilfers, sojaschroot, tarwe, tarwegries, tarwezemelgrint en zonnebloemzaadschroot. Het gemiddelde percentage fosfor (P) dat gebonden was in fytinezuur en anorganisch fosfaat bedroeg respectievelijk 73% en 14% voor de onderzochte grondstoffen, met uitzondering van rogge.

De enzymatische omzetbaarheid van fytinezuur naar oplosbaar anorganische fosfaat werd voor de genoemde grondstoffen in vitro bepaald door een incubatie gedurende 6 uur bij kamertemperatuur met en zonder toevoeging microbieel fytase. De gemiddelde enzymatische omzetbaarheid van fytinezuur-P zonder toevoeging van microbieel fytase bedroeg 30% en varieerde van 0% voor sojaschroot tot 85% voor tarwe. Toevoeging van microbieel fytase (500 FTU/kg) leidde tot een gemiddelde toename van de enzymatische omzetbaarheid van 17%. De toename werd met name waargenomen bij grondstoffen met een lage intrinsieke fytase activiteit, zoals mais, erwten en sojaschroot, en werd met name veroorzaakt door een verhoogde afbraak van het oplosbare fytinezuur. Voor grondstoffen met een hoge intrinsieke fytase activiteit, zoals rogge en tarwe, was deze toename met name gekoppeld aan een toename van de oplosbaarheid van fytinezuur.

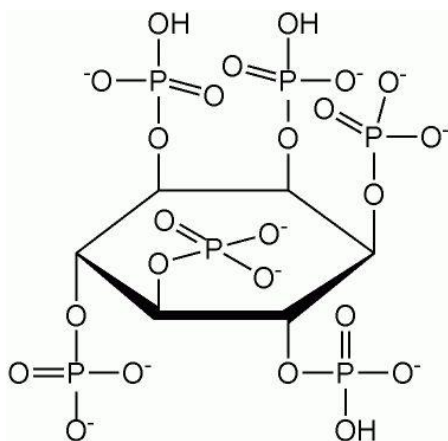
De hoogste fytase activiteit werd in de onderzochte grondstoffen aangetoond in rogge en tarwe. Op basis van deze activiteit en de hoge enzymatische omzetbaarheid van fytinezuur zijn beide producten als bron voor intrinsiek fytase verder onderzocht. Op basis van de gevonden effecten voor de toevoeging van microbieel fytase werden erwten, mais en sojaschilfers geselecteerd als fytinezuurbronnen voor verder onderzoek.

De aanwezigheid van intrinsiek fytase door toevoeging van rogge en tarwe leidde na incubatie van 6 uur bij kamertemperatuur tot een hogere P-beschikbaarheid (fractie oplosbaar anorganisch P) van mais en sojaschilfers, terwijl voor erwten geen effect werd gevonden. Deze P-beschikbaarheid werd voor alle drie grondstoffen sterk verhoogd door een aanvullende incubatie gedurende 1 uur bij 37°C. Een voor-incubatie met pepsine-HCl bij pH 2 leidde tot een afname van de fytase activiteit die in het geval van sojaschilfers en erwten grotendeels kon worden gecompenseerd door het verlengen van de tijd bij de vervolg incubatie bij pH 5.5 van 2 naar 6 uur. In combinatie met mais kon de beschadiging van fytase door de lage pH niet worden gecompenseerd door een verlenging van de incubatie tijd.



# 1 Inleiding

Het merendeel van fosfor (P) in plantaardige grondstoffen is vastgelegd in fytinezuur dat bestaat uit een inositol ringstructuur waaraan zes fosfaatgroepen zijn gebonden (zie Figuur 1.1).



**Figuur 1.1** Chemische structuur van fytinezuur.

Fytinezuur kan worden afgebroken met behulp van het enzym fytase maar dit is van nature slechts zeer beperkt aanwezig in het maag-darmkanaal van varkens en pluimvee waardoor het gebonden P voor de varkens en pluimvee nauwelijks beschikbaar is. Om aan de P behoefte te voldoen wordt anorganisch fosfaat, meestal in de vorm van mono- of dicalciumfosfaat (MCP of DCP), aan het voer toegevoegd. Deze aanpak heeft echter twee grote nadelen. Ten eerste zijn de beschikbare voorraden aan anorganisch P beperkt en deze zullen op den duur uitgeput zijn. Ten tweede leidt de aanwezigheid van onverteerd fytinezuur tot een hoog gehalte aan fosfor in de mest waardoor een groter areaal landbouwgrond nodig is om deze mest verantwoord af te zetten. Daarnaast is de lage verhouding stikstof (N):P ongunstig voor het gebruik als meststof omdat bij maximale toediening van P uit dierlijke mest de N voorziening nog onvoldoende is.

De potentiële oplossing voor beide problemen is het verbeteren van de verteerbaarheid van het organische fytinezuur door de toevoeging van het enzym *fytase*. Dit enzym splitst de fosfaatgroepen van het inositol molecuul waardoor het slecht verteerbaar organisch P wordt omgezet in goed opneembaar orthofosfaat. Sinds de jaren 90 wordt deze aanpak op grote schaal toegepast door standaard microbiële *fytase* (dosering veelal  $\geq 500$  FTU/kg) aan voeders toe te voegen, waarmee in de praktijk de P verteerbaarheid van de grondstoffen aanzienlijk wordt verbeterd. De productie van microbiële *fytase* gebeurde aanvankelijk via gisten, echter de laatste jaren worden hiervoor steeds vaker genetische gemodificeerde bacteriën (GMO's) gebruikt.

Binnen de biologische landbouw is het gebruik van GMO's verboden, waardoor het gebruik van microbiële *fytase* voor het verbeteren van de P verteerbaarheid niet mogelijk is. Een alternatief is het optimaal gebruik maken van intrinsiek *fytase* in grondstoffen, met name in granen door combinatie van dergelijke *fytase*-rijke grondstoffen met grondstoffen die rijk zijn aan fytine-P. De *fytase* activiteit in granen, vooral in rogge (en tarwe) is dusdanig hoog dat deze grondstoffen een aantrekkelijk alternatief zouden kunnen zijn voor microbiële *fytase*.

Het doel van dit onderzoek is om het gericht gebruik van intrinsiek *fytase* voor de afbraak van fytinezuur-P in biologische grondstoffen nader te onderzoeken. Deze afbraak kan zowel voor het verstrekken van het voer als tijdens het verteringsproces in het dier plaats vinden. Afbraak van fytinezuur-P voor het verstrekken van het voer heeft als voordeel dat de incubatie condities eenvoudiger zijn te optimaliseren en controle op de effectiviteit van de enzymatische omzetting mogelijk is. Om de praktische haalbaarheid van deze aanpak te bepalen, zijn de meeste incubaties bij kamertemperatuur uitgevoerd. Het onderzoek is opgebouwd uit vier fasen.

---

De enzymatische omzetbaarheid van fytinezuur en de aanwezige *fytase* activiteit in diverse relevante grondstoffen zijn respectievelijk in de eerste en tweede fase onderzocht. Op basis van deze resultaten is een selectie van grondstoffen als bron van fytinezuur en *fytase* gemaakt die tijdens de derde en vierde fase verder zijn onderzocht. In de derde fase is de P beschikbaarheid onder invloed van intrinsiek *fytase* voor deze combinaties onderzocht. In deze studie is P beschikbaarheid gedefinieerd als de fractie totaal opgelost anorganisch P ten opzichte van de totale hoeveelheid P in een monster. Deze fractie bevat zowel het enzymatisch omzetbaar fytinezuur-P als het oorspronkelijk aanwezige anorganisch P in een monster. In fase vier is het effect van een voor-incubatie onder maagcondities (pH 2) op de P beschikbaarheid voor deze combinaties onderzocht om na te gaan of intrinsiek *fytase* bestand is tegen de condities in de maag en of deze condities de effectiviteit beïnvloeden.

Dit onderzoek is uitgevoerd in kader van het PPS-project Vermindering fosforexcretie door biologisch gehouden varkens en pluimvee, werkplan 2015 AF 15105) en de gebruikte protocollen en de keuze van de grondstoffen is in overleg met de begeleidingsgroep gebeurd.

## 2. Materiaal en Methode

### 2.1 Materiaal

De gebruikte grondstoffen werden gekozen op basis van hun beschikbaarheid en relevantie voor de biologische dierhouderij. De meeste grondstoffen waren afkomstig van Reudink BV, Lochem (onderdeel van ForFarmers) aangevuld met enkele grondstoffen afkomstig uit eerder uitgevoerd verteringsonderzoek. De monstervoorbereiding bestond uit malen over 1 mm. Een overzicht van de gebruikte grondstoffen (inclusief in welke fase deze zijn gebruikt), staat vermeld in Tabel 2.1

**Tabel 2.1** Grondstoffen en de fase waarin ze gebruikt zijn.

Grondstof	Fase
DDGS	1
Erwten	1 + 2 + 3 + 4
Gerst	1 + 2
Mais	1 + 2 + 3 + 4
Maisglutenvoer	1
Raapzaadschilfers	1
Rogge	1 + 2 + 3 + 4
Sojaschilfers	3 + 4
Sojaschroot	1
Tarwe	1 + 2 + 3 + 4
Tarwegries	1 + 2
Tarwezemelgrint	1 + 2
Zonnebloemzaadschroot	1

### 2.2 Methode

#### 2.2.1 Karakterisering grondstoffen

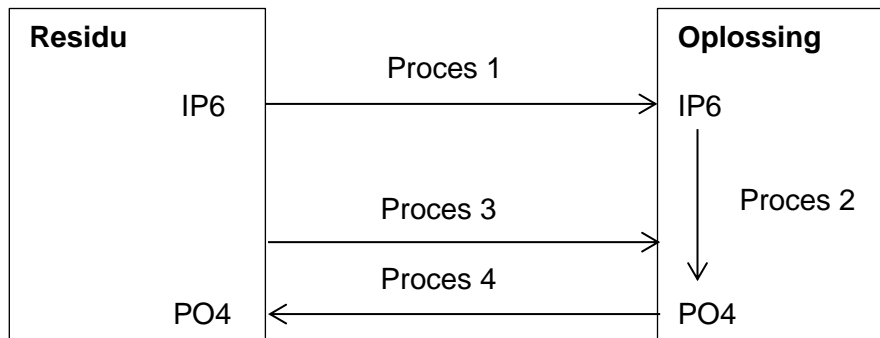
De grondstoffen werden chemisch onderzocht op totaal-P, fytinezuur-P en anorganisch-P (is orthofosfaat-P). De gehalten aan totaal-P in de diverse grondstoffen waren afkomstig van eerder uitgevoerde analyses. Het gehalte aan anorganisch-P en fytinezuur-P werd enzymatisch bepaald met behulp van een commerciële testkit (Megazyme K-PHYT 08/14, Ierland), zoals beschreven door McKie en McCleary (2016). Deze methode was gebaseerd op een extractie van fytinezuur onder zure condities. Hiermee wordt beoogd alle fytinezuur beschikbaar te maken voor afbraak door fytase. Het extract werd met en zonder toevoeging van microbiële *fytase* en *alkalische fosfatase* geïncubeerd waarna in beide oplossingen het gehalte aan anorganisch-P spectrometrisch werd bepaald. Het gehalte gevonden in de oplossing zonder toevoeging van beide enzymen werd gebruikt voor de berekening van het gehalte aan anorganisch P. Het verschil in gehalten aan anorganisch-P tussen de oplossing met en zonder toevoeging van beide enzymen werd gebruikt voor de berekening van het gehalte aan fytinezuur-P. Door afbraak onder invloed van intrinsiek fytase kan het gehalte aan fytinezuur-P onderschat worden, omdat het fytinezuur dat door intrinsiek fytase wordt afgebroken in de testkit niet meer als fytinezuur wordt gemeten.

#### 2.2.2 Enzymatisch omzetbaarheid fytinezuur

De enzymatische omzetbaarheid van fytinezuur is de relatieve hoeveelheid fytinezuur die met of zonder toevoeging van microbiële fytase, bij pH 5.5 in anorganisch fosfaat wordt omgezet. In tegenstelling tot de fytinezuur-P bepaling (2.2.1) bevatte deze bepaling geen extractie onder zure condities. De enzymatische omzetting geschiedt aan de hand van twee processen (zie figuur 3.1):

1. Oplossen van het aanwezige fytinezuur (proces 1)
2. Afbraak van het opgeloste fytinezuur (proces 2).

De enzymatische omzetbaarheid werd gemeten via een incubatie van 2.5 gram grondstof in 50 ml acetaatbuffer pH 5.5 met of zonder toevoeging van microbiële *fytase* bij kamertemperatuur. Het gehalte aan anorganisch P in de oplossing werd naast de eerder genoemde processen ook beïnvloed door het oplossen van het in de grondstof aanwezige anorganisch P (proces 3) en het neerslaan van het vanuit de afbraak van fytinezuur gevormde anorganisch P (proces 4). De berekening van de afbreekbaarheid van fytinezuur bevat een correctie voor beide processen.



**Figuur 3.1** Processen tijdens de incubatie ter bepaling van de afbreekbaarheid.

De incubatie werd na 6 uur gestopt waarna het residu en de vloeistof door middel van centrifugeren werden gescheiden. De hoeveelheid anorganisch P ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) werd in de oplossing bepaald. De hoeveelheid aan fytinezuur-P (IP-P) en anorganisch P werd in het residu via de eerder beschreven methode (zie 2.2.1) bepaald. Het volledige protocol staat vermeld in Bijlage 1. De oplosbaarheid van fytinezuur-P werd berekend als:

$$\text{Oplosbaarheid IP-P (proces 1)} = 100\% - (\text{IP-P}_{\text{residu}}(\text{mg}) * 100\% / \text{IP-P}_{\text{inweeg}}(\text{mg})) \quad (1)$$

De afbraak van oplosbaar fytinezuur werd berekend als:

$$\begin{aligned} \text{Afbraak IP-P (proces 2)} = \\ (\text{PO}_4\text{-P}_{\text{oplossing}}(\text{mg}) - (\text{PO}_4\text{-P}_{\text{inweeg}}(\text{mg}) - \text{PO}_4\text{-P}_{\text{residu}}(\text{mg}))) * 100\% / \\ (\text{IP-P}_{\text{inweeg}}(\text{mg}) - \text{IP-P}_{\text{residu}}(\text{mg})) \end{aligned} \quad (2)$$

De enzymatische omzetbaarheid van fytinezuur-P werd berekend als:

$$\text{Enzymatische omzetbaarheid IP-P} = \text{oplosbaarheid} * \text{afbraak} \quad (3)$$

### 2.2.3 Activiteit *fytase* in grondstoffen

De activiteit van intrinsiek *fytase* werd in een beperkt aantal grondstoffen bepaald. Deze selectie was gebaseerd op gegevens in de literatuur over de aanwezigheid van *fytase* in de betreffende grondstof. De activiteit werd bepaald op basis van het vrijkomen van oplosbaar anorganisch-P tussen 1 en 4 uur incubatie bij kamertemperatuur. Deze incubatie werd uitgevoerd met en zonder de toevoeging van een aanvullend substraat (opgelost natrium-fytaat) en met of zonder additioneel microbiële *fytase* (dosering: 500 en 5000 FTU/kg). Het uitgebreide protocol staat in Bijlage 2 vermeld.

### 2.2.4 Effectiviteit intrinsiek *fytase*

Negen combinaties van 3 fytinezuur-P bevattende grondstoffen (erwten, mais en sojaschilfers) en 3 *fytase*bronnen (rogge, tarwe en microbiële *fytase*) werden gedurende 2 uur geïncubeerd waarna het beschikbare P (opgelost fosfaat-P) vanuit de betreffende grondstoffen werd gemeten. Deze resultaten werden gecorrigeerd voor de bijdrage van beschikbaar P vanuit de *fytase*bronnen (rogge en tarwe). Het protocol en de berekening staan in bijlage 3 vermeld.

---

### 2.2.5 Pepsine-HCl bestendigheid van intrinsiek *fyfase*

Het effect van een voor-incubatie met pepsine-HCl (maag simulatie) op de P beschikbaarheid werd voor 6 combinaties van 3 fytimezuur-P grondstoffen (erwten, mais en sojaschilfers) en 2 fyfasebronnen (rogge en tarwe) onderzocht. Na de voor-incubatie werd de P beschikbaarheid bepaald door een incubatie bij pH 5.5 na 2 en 6 uur. Als referentie werd een voor-incubatie met water in plaats van pepsine-HCl gebruikt. Het protocol en de berekening staan in Bijlage 4 vermeld.

## 3. Resultaten

### 3.1 Karakterisering grondstoffen

Het gehalte aan totaal-P in de grondstoffen varieerde van 2.8 g/kg in mais tot 12.6 g/kg in tarwezemelgrint (Tabel 3.1).

Het gemiddelde percentage fytinezuur-P (IP-P) ten opzichte van totaal-P was 70% en varieerde van 40% in rogge tot 85% in zonnebloemschilfers. Het lager percentage in DDGS was een gevolg van het productieproces waarbij de *fytase* in de toegevoegde gisten reeds voor een enzymatische omzetting van het aanwezige fytinezuur-P zorgde. Het afwijkende percentage in rogge ten opzichte van de andere granen werd zeer waarschijnlijk veroorzaakt door de hoge intrinsieke *fytase* activiteit in deze grondstof waardoor het gehalte aan fytinezuur-P met de gebruikte enzymatische methode werd onderschat. Het gemiddelde percentage fytinezuur-P ten opzichte van totaal-P zonder rogge was 73% en varieerde van 45% in DDGS tot 85% in zonnebloemschilfers.

Het gemiddelde percentage anorganisch P ten opzichte van totaal-P was 16% en varieerde van 3% in tarwe tot 49% in rogge. Het hoge percentage in DDGS was een gevolg van de enzymatische omzetting tijdens het productie proces. Het afwijkende percentage in rogge ten opzichte van de andere granen werd ook bij deze bepaling waarschijnlijk veroorzaakt door de hoge intrinsieke *fytase* activiteit in deze grondstof waardoor het gehalte aan anorganisch P met de gebruikte enzymatische methode werd overschat. Het gemiddelde percentage anorganisch P gebonden ten opzichte van totaal-P zonder rogge was 14% en varieerde van 3% in tarwe tot 40% in DDGS.

Het gemiddelde percentage rest-P ten opzichte van totaal-P was 14% en varieerde van niet aanwezig in zonnebloemschroot tot 21% in erwten en tarwe. Deze rest fractie bestond uit mogelijk aanwezig overige organische P-verbindingen, zoals fosforlipiden, slecht oplosbare P-bevattende zouten en onvolledige enzymatisch omgezette fytine-P.

**Tabel 3.1** Totaal gehalte aan P en de percentages IP-P; PO<sub>4</sub>-P en rest-P ten opzichte van totaal-P in de onderzochte grondstoffen.

Grondstof	Gehalte P (g/kg)	Percentage (%) t.o.v. totaal-P		
		IP-P	PO <sub>4</sub> -P	Rest-P
DDGS	8.3	45	40	16
Erwten	3.9	70	9	21
Gerst	3.4	74	11	15
Mais	2.8	76	9	15
Maisglutenvoer	9.1	72	25	4
Raapzaadschilfers	9.0	81	7	12
Rogge	3.4	40	49	12
Sojaschroot	6.1	71	10	18
Tarwe	3.2	76	3	21
Tarwegries	9.4	81	7	12
Tarwezemelgrint	12.6	73	12	15
Zonnebloemzaadschroot	10.0	85	16	-1

### 3.2 Enzymatische omzetbaarheid fytinezuur

De gemiddelde relatieve oplosbaarheid van fytinezuur-P (zonder toevoeging van *fytase*) was 78% en varieerde van 62% voor raapzaadschilfers tot 96% voor gerst (Tabel 3.2). De oplosbaarheid was voor schilfers en schroten duidelijk lager dan voor de granen. Incubatie met microbiële *fytase* verhoogde de gemiddelde relatieve oplosbaarheid van fytinezuur-P tot 91%. De relatieve fytinezuur-P oplosbaarheid van de individuele grondstoffen na toevoeging van microbiële *fytase* varieerde van 77% voor sojaschroot en 98% voor tarwe. Toevoeging van microbiële *fytase* had het grootste additionele effect bij grondstoffen met een relatieve lage fytinezuur oplosbaarheid waardoor de verschillen in fytinezuur oplosbaarheid tussen de onderzochte grondstoffen afnam.



**Tabel 3.2** *Relatieve oplosbaarheid<sup>1</sup> van fytinezuur-P (in %) per grondstof met en zonder toevoeging van microbiel fytase (500 FTU/g) na een incubatie gedurende 6 uur bij kamertemperatuur, en het verschil tussen beide (in %).*

Grondstof	Toevoeging fytase		
	Zonder	Met	Vershil
DDGS	74	80	6
Erwten	75	93	18
Gerst	96	97	1
Mais	93	97	4
Maisglutenvoer	86	94	8
Raapzaadschilfers	62	88	26
Rogge	77	97	20
Sojaschroot	63	77	14
Tarwe	85	98	13
Tarwegries	81	97	16
Tarwezemelgrint	83	96	13
Zonnebloemzaadschroot	67	78	11

<sup>1</sup> Bepaald als het verschil tussen fytinezuur-P in uitgangsmateriaal op t=0 en fytinezuur-P in residu na 6 uur incubatie en centrifugeren.

De gemiddelde relatieve afbraak van opgelost fytinezuur-P zonder toevoeging van microbiel fytase bedroeg 37% en varieerde van 0% bij sojaschroot tot 100 % bij rogge en tarwe (zie Tabel 3.3). Deze extreme verschillen werden veroorzaakt door de variatie in intrinsieke fytase activiteit tussen de onderzochte grondstoffen. Deze activiteit was met name hoog in rogge, tarwe en tarwebijproducten en laag in de schroten/schilfers, mais en maisproducten. Opvallend was de relatief hoge afbraak in DDGS gezien de waarschijnlijk lage intrinsieke fytase activiteit in dit product. De gemiddelde relatieve enzymatische omzetting van opgelost fytinezuur-P met toevoeging van microbiel fytase bedroeg 51% en varieerde van 13% bij maisglutenvoer tot 100 % bij rogge. Het grootste effect van microbiel fytase werd gevonden bij de grondstoffen DDGS, erwten, mais en sojaschroot. Ondanks dit effect bleef de relatieve enzymatische omzetting van opgelost fytinezuur-P voor het merendeel van de onderzochte grondstoffen ondanks de aanwezigheid van microbiel fytase kleiner dan 50%.

**Tabel 3.3** *Relatieve afbraak van opgelost fytinezuur-P (in %) met en zonder toevoeging van microbiel fytase (500 FTU/g) na een incubatie gedurende 6 uur bij kamertemperatuur, en het verschil tussen beide (in %).*

Grondstof	Toevoeging fytase		
	Zonder	Met	Vershil
DDGS	53	83	30
Erwten	14	43	29
Gerst	53	66	13
Mais	8	53	45
Maisglutenvoer	5	13	8
Raapzaadschilfers	11	21	10
Rogge	> 100	> 100	0
Sojaschroot	0	23	23
Tarwe	> 100	98	0
Tarwegries	55	45	-10
Tarwezemelgrint	29	34	13
Zonnebloemzaadschroot	7	18	11

De gemiddelde enzymatische omzetbaarheid van fytinezuur-P zonder toevoeging van microbiel fytase bedroeg 30% en varieerde van 0% voor sojaschroot tot 85% voor tarwe (tabel 3.4). Het gemiddelde effect van de toevoeging van microbiel fytase op de enzymatische omzetting van fytinezuur-P naar anorganisch fosfaat bedroeg 17% en varieerde van 0% bij tarwegries tot 44% bij mais. Voor grondstoffen met een lage intrinsieke fytase activiteit, zoals mais, erwten en sojaschroot, werd deze toename voornamelijk veroorzaakt door een verhoogde afbraak van het oplosbare fytinezuur. Voor grondstoffen met een hoge intrinsieke fytase activiteit, zoals rogge en tarwe, werd deze toename met name veroorzaakt door een toename van de oplosbaarheid van fytinezuur.

**Tabel 3.4** Enzymatische omzetbaarheid<sup>1</sup> van fytinezuur-P (in %) met en zonder toevoeging van microbieel fytase (500 FTU/g) na een incubatie gedurende 6 uur bij kamertemperatuur, en het verschil tussen beide (in %).

Grondstof	Toevoeging fytase		
	Zonder	Met	Vershil
DDGS	39	66	27
Erwten	11	40	29
Gerst	51	64	13
Mais	8	52	44
Maisglutenvoer	5	13	8
Raapzaadschilfers	7	19	12
Rogge	77	97	20
Sojaschroot	0	23	23
Tarwe	85	96	11
Tarwegries	45	45	0
Tarwezemelgrint	29	34	5
Zonnebloemzaadschroot	7	18	11

<sup>1</sup> Berekend als oplosbaarheid \* afbraak

### 3.3 Fytase activiteit in grondstoffen

De fytase activiteit is in een beperkt aantal grondstoffen met en zonder toegevoegd substraat en microbieel fytase bepaald (Tabel 3.5). Door de afwijkende meetcondities, met name de incubatie periode en temperatuur ten opzichte van de standaard methode zijn de resultaten niet te vergelijken met de fytase activiteiten zoals beschreven in de literatuur.

Toevoeging van een fytinezuur-P bron als substraat leidde tot een sterke toename van de gemiddelde gemeten activiteit van 50 naar 276 FTU/kg, waaruit bleek dat de beschikbare hoeveelheid fytinezuur-P in deze grondstoffen limiterend was voor de enzymatische omzetting door het aanwezige fytase. Deze zeer beperkte beschikbaarheid werd met name waargenomen bij de onderzochte tarwebijproducten (tarwegries en tarwezemelgrint) en bij rogge.

Opvallend was het relatief geringe effect van de toegevoegde hoeveelheid microbieel fytase. De gemiddelde gemeten activiteit nam toe van 276 FTU/kg zonder toevoeging naar 289 en 345 FTU/kg bij een toevoeging van respectievelijk 500 FTU/kg en 5000 FTU/kg. Dit geringe effect kan mogelijk worden veroorzaakt door de gebruikte methode voor het meten van de activiteit, namelijk de toename in de hoeveelheid oplosbaar anorganisch fosfaat tussen 1 en 4 uur. Het positieve effect van de toevoeging van microbieel fytase was wel zichtbaar in de snelheid waarmee fytaat werd afgebroken. Het vrijgemaakte P-fosfaat was gemiddelde 5.7 en 26.9 µmol hoger bij toevoeging van respectievelijk 500 en 5000 FTU/kg microbieel fytase dan zonder toevoeging na een incubatie van 1 uur.

**Tabel 3.5** Fytase activiteit<sup>1</sup> (FTU/kg) in grondstoffen met en zonder toevoeging van fytinezuur-P (als substraat) en zonder (+ 0 FTU/kg) en met (+ 500 FTU/kg en + 5000 FTU/kg) toegevoegd microbieel fytase.

Grondstoffen	Geen toevoeging		Toevoeging fytinezuur-P	
	+ 0 FTU	+ 0 FTU	+ 500 FTU/kg	+ 5000 FTU/kg
Gerst	49.6	80.0	123	233
Tarwe	79.7	204	239	298
Tarwegries	12.6	374	366	405
Rogge	109	401	362	405
Tarwezemelgrint	< 0	321	347	387

<sup>1</sup> Gemeten als de toename in oplosbaar anorganisch fosfaat gedurende 1 en 4 uur incubatie bij kamertemperatuur.

Op basis van de gemeten fytaseactiviteiten en de hoge mate van afbreekbaarheid van het fytinezuur-P (tabel 3.4) zijn rogge en tarwe als fytase-bronnen geselecteerd.

### 3.4 Effectiviteit intrinsiek *fyase*

Het effect van intrinsiek *fyase* vanuit rogge en tarwe op de P-beschikbaarheid (is de totale hoeveelheid oplosbaar anorganisch-P) van erwten, mais en sojaschilfers varieerde sterk tussen de grondstoffen (zie Tabel 3.6). De P-beschikbaarheid van erwten was laag en werd niet verhoogd door de aanwezigheid van het intrinsiek *fyase* vanuit rogge en tarwe in tegenstelling tot de toevoeging van microbiel *fyase*. De P-beschikbaarheid van mais was ook laag maar werd wel verhoogd door de aanwezigheid van het intrinsiek *fyase* vanuit rogge en tarwe. De P-beschikbaarheid na toevoeging van rogge was vergelijkbaar met de waarde gevonden na toevoeging van microbiel *fyase*. Het grootste effect van toevoeging van intrinsiek *fyase* op de P-beschikbaarheid werd voor sojaschilfers gevonden. Toevoeging van rogge leidde voor deze grondstof tot een hogere P beschikbaarheid dan additie van microbiel *fyase*. Het grotere toevoegingseffect van rogge op de P-beschikbaarheid van mais en sojaschilfers was gerelateerd aan de hoge intrinsieke *fyase* activiteit in dit product. Opvallend was dat het toevoegingseffect voor beide grondstoffen numeriek gelijk was. Door toevoeging van rogge en tarwe nam voor beide grondstoffen de P-beschikbaarheid met respectievelijk 18 en 8% toe. De maximale P-beschikbaarheid bedroeg slechts 41% en werd gevonden voor de combinatie sojaschilfers en rogge. De verschillen tussen de grondstoffen bleven ook na deze toevoeging aanwezig hetgeen in tegenstelling was tot de effecten gevonden na toevoeging van commercieel microbiel *fyase*.

**Tabel 3.6** *P beschikbaarheid<sup>1</sup> (%) vanuit de grondstoffen erwten, mais en sojaschilfers zonder toevoeging van fyasebronnen, of met toevoeging van ofwel intrinsiek fyase vanuit rogge en tarwe of microbiel fyase na 2 uur incubatie bij kamertemperatuur.*

Grondstoffen	Fytase bron			
	Geen fyase bron	Rogge	Tarwe	+ 500 FTU/kg
Erwten	14	9	14	27
Mais	15	33	23	33
Sojaschilfers	23	41	31	33

<sup>1</sup> Berekend als totaal oplosbaar anorganisch P / totaal aanwezig P \* 100, waarbij gecorrigeerd is voor de P-beschikbaarheid vanuit rogge of tarwe.

### 3.5 Pepsine-HCl bestendigheid intrinsiek *fyase*

Het effect van een voor-incubatie met pepsine-HCl op de P-beschikbaarheid was afhankelijk van de grondstoffen en de tijd van incubatie bij pH 5.5 (Tabel 3.7). De voor-incubatie leidde voor alle onderzochte combinaties tot een afname van de *fyase* activiteit zoals bleek uit de lagere P-beschikbaarheid gemeten na een 2 uren incubatie bij pH 5.5. De gemiddelde absolute afname van de P beschikbaarheid voor de onderzochte grondstoffen varieerde van 13% voor sojaschilfers tot 72% voor mais. Voor sojaschilfers kon deze afname in P beschikbaarheid bijna volledig worden gecompenseerd door het gebruik van een langere incubatietijd bij pH 5.5, zoals bleek uit de resultaten verkregen na 6 uren incubatie. Voor erwten gold dit ook voor de incubatie met rogge. Echter bij gebruik van tarwe als fyasebron bleef de P beschikbaarheid ook na 6 uren incubatie duidelijk lager dan de resultaten zonder voor-incubatie. Het verlengen van de incubatietijd bij pH 5.5 leidde niet tot een toename van de P beschikbaarheid van mais. Blijkbaar leidde de voor-incubatie met pepsine-HCl in het geval van mais tot een volledige irreversibele beschadiging van het aanwezige intrinsieke *fyase*.

De P beschikbaarheden gevonden zonder voor-incubatie lagen duidelijk hoger dan de resultaten vanuit het vorige experiment (zie Tabel 3.6). Dit verschil werd waarschijnlijk veroorzaakt door de extra incubatiestap van 1 uur bij 37°C die een positief effect op de efficiëntie van de enzymatische reactie had.

**Tabel 3.7** P beschikbaarheid<sup>1</sup> (%) vanuit beide grondstoffen na eerst een voor-incubatie zonder en met pepsine-HCl gedurende 1 uur bij 37°C, gevolgd door een na-incubatie gedurende 2 en 6 uren bij pH 5.5 bij kamertemperatuur.

Grondstof combinatie	Voor-incubatie bij 37°C			
	Zonder pepsine - HCl		Met pepsine -HCl	
	2 uur	6 uur	2 uur	6 uur
Sojaschilfers + rogge	94	94	84	91
Erwten + rogge	85	81	34	83
Mais + rogge	100	100	26	25
Sojaschilfers + tarwe	74	80	59	83
Erwten + tarwe	74	74	13	46
Mais + tarwe	79	79	10	12

<sup>1</sup> berekend als totaal oplosbaar anorganisch P / totaal aanwezig P \* 100

---

## 4. Discussie

Het doel van dit onderzoek was om de mogelijkheid van het gebruik van intrinsiek *fytase* vanuit grondstoffen als alternatief voor microbiel *fytase* te onderzoeken. De resultaten van dit onderzoek tonen aan dat dit mogelijk was maar dat de efficiëntie van deze aanpak sterk afhing van de gebruikte grondstoffen en condities waaronder de incubaties plaatsvonden.

De onderzochte grondstoffen varieerden sterk wat betreft de enzymatische omzetting van fytinezuur-P. Deze afbraak werd bepaald door twee processen: het oplossen van fytinezuur en de afbraak van opgelost fytinezuur. Voor de meeste onderzochte grondstoffen bleek dat de afbraak van fytinezuur-P met name door een lage afbraak van opgelost fytinezuur werd veroorzaakt. Voor erwten, mais en sojaschroot werd dit veroorzaakt door een lage intrinsieke *fytase* activiteit die door toevoeging van microbiel *fytase* kon worden gecompenseerd wat leidde tot een verhoogde afbraak van fytinezuur-P. Voor maisglutenvoer, raapzaadschilfers en zonnebloemzaadschroot bleef de afbraak van fytinezuur-P ondanks de toevoeging van microbiel *fytase* erg laag (< 20%). In deze grondstoffen waren blijkbaar andere factoren, zoals toegankelijkheid en complexvorming van fytinezuur, verantwoordelijk voor de lage afbraak. De hoogste afbraak van fytinezuur-P werd aangetoond in onbehandelde grondstoffen met een hoge intrinsieke *fytase* activiteit, zoals rogge en tarwe. Deze grondstoffen zijn derhalve als potentiële alternatieven voor microbiel *fytase* binnen dit onderzoek nader onderzocht.

De effectiviteit van intrinsiek *fytase* vanuit rogge en tarwe was afhankelijk van de gebruikte grondstoffen en de gebruikte incubatie condities. Voor mais en sojaschilfers nam de P beschikbaarheid ten gevolge van de aanwezigheid van het intrinsiek *fytase* duidelijk toe terwijl voor erwten geen positief effect werd waargenomen bij kamertemperatuur. Deze effectiviteit verbeterde aanzienlijk indien een aanvullende incubatie gedurende één uur bij 37°C werd uitgevoerd. Een mogelijke reden voor dit effect is de betere ontsluiting van zowel de fytinezuur als het intrinsiek *fytase* en de hogere *fytase* activiteit bij deze hogere temperatuur. Voor-incubatie met pepsine-HCl leidde tot een afname van de intrinsieke *fytase* activiteit echter de mate van beschadiging was opvallend genoeg ook afhankelijk van de gebruikte fytinezuur grondstof. De sterkste beschadiging werd waargenomen bij het gebruik van mais, die niet kon worden gecompenseerd door een langere incubatie bij pH 5.5. De mate van beschadiging van het intrinsieke *fytase* door de pepsine-HCl voor-incubatie was mogelijk negatief gerelateerd aan het gehalte aan eiwit in de aanwezige grondstoffen. Het hogere eiwit gehalte in sojaschilfers werkte mogelijk beschermd doordat het *fytase* eiwit daardoor minder bloot stond aan de proteolytische activiteit van het aanwezige pepsine.

De resultaten van deze studie tonen aan dat intrinsiek *fytase* vanuit de individuele grondstoffen kan bijdragen aan de afbraak van fytinezuur in het voer. De mate van afbraak is echter afhankelijk van de gebruikte grondstoffen, zowel voor de fytinezuur als de *fytase* bron(nen), en de incubatie condities, met name temperatuur en tijd. Bij het toepassen van deze aanpak in de praktijk moet met deze variatie rekening te worden gehouden. De resultaten tonen aan dat deze aanpak leidt tot een goede afbraak van fytinezuur-P bij 37°C en dat deze aanpak mogelijk tot een significante verbetering van de totale P verteerbaarheid in voeders kan leiden. Uit de maag simulatie blijkt tevens de kans op irreversibele beschadiging van *fytase* na incubatie bij een lage pH. Deze kans op beschadiging is naast de eerder genoemde voordelen, zoals controleerbaarheid van incubatie condities en effectiviteit, een extra argument om de praktische haalbaarheid van voor-incubatie van het voer of de individuele grondstoffen met *fytase* te onderzoeken. Deze praktische haalbaarheid dient verder uitgezocht te worden.

---

## 5. Conclusies

De belangrijkste conclusies uit deze studie zijn als volgt:

- De gemiddelde enzymatische omzetbaarheid van fytinezuur-P zonder toevoeging van microbieel fytase bedroeg 30% en varieerde van 0% voor sojaschroot tot 85% voor tarwe.
- Toevoeging van microbieel fytase (500 FTU/kg) leidde tot een gemiddelde toename van de enzymatische omzetbaarheid van 17%. De toename werd met name waargenomen bij grondstoffen met een lage intrinsieke fytase activiteit, zoals mais, erwten en sojaschroot, en werd met name veroorzaakt door een verhoogde afbraak van het oplosbare fytinezuur. Voor grondstoffen met een hoge intrinsieke fytase activiteit, zoals rogge en tarwe, was deze toename met name gekoppeld aan een toename van de oplosbaarheid van fytinezuur.
- De hoogste fytase activiteit werd in de onderzochte grondstoffen aangetoond in rogge en tarwe.
- De aanwezigheid van intrinsiek fytase door toevoeging van rogge en tarwe leidde tot een hogere P-beschikbaarheid (fractie oplosbaar anorganisch P) van mais en sojaschilfers, terwijl voor erwten geen effect werd gevonden. Deze P-beschikbaarheid werd voor alle drie grondstoffen sterk verhoogd door een aanvullende incubatie gedurende 1 uur bij 37°C.
- Een voor-incubatie met pepsine-HCl bij pH 2 leidde tot een afname van de fytase activiteit die in het geval van sojaschilfers en erwten grotendeels kon worden gecompenseerd door de verlengen van de tijd bij de vervolg incubatie bij pH 5.5 van 2 naar 6 uur. In combinatie met mais kon de beschadiging van fytase door de lage pH niet worden gecompenseerd door een verlenging van de incubatie tijd.

### Praktische aanbevelingen

Deze studie toont aan dat het mogelijk is om de P-beschikbaarheid van biologische grondstoffen, waarvan het fytaat goed oplosbaar is, in sterke mate te verhogen door deze te combineren met biologische grondstoffen met een hoog intrinsiek fytasegehalte. Voorwaarde is wel dat fytaat en fytase voldoende tijd krijgen om met elkaar te reageren. Er is behoefte aan dierexperimenten om de gevonden *in vitro* effecten onder *in vivo* condities te valideren. Tevens dient nagegaan te worden wat de effecten van de procescondities in een mengvoerfabriek zijn op de fytaseactiviteit van de biologische grondstoffen.

---

# Referenties

McKie, V. A., and B. V. McCleary. 2016. A novel and rapid colorimetric method for measuring total phosphorus and phytic acid in foods and animal feeds. *J. AOAC Int.* 99(3):738-743.

---

# Bijlage 1 Protocol Enzymatische omzetbaarheid fytinezuur P

## **Protocol:**

Elke grondstof wordt met en zonder toegevoegde fytase in de zelfde serie geïncubeerd.

1. 2.5 gram van de te onderzoeken grondstof wordt gesuspenderd in 50 ml 0.25 M Acetaat buffer pH 5.5  
Bereiding buffer: Los 1,82 g azijnzuur, 30,02 g natrium acetate, 0,147 g calcium chloride en 1 ml Brij 35 oplossing (100 g/l) op in 900 ml water en vul aan tot 1000 ml). Controleer of de pH van de oplossing tussen 5.45 en 5.55 ligt.
2. Voeg per grondstof aan één van de oplossingen 1.25 FTU fytase toe.  
Bereiding: Uitgangsmateriaal *Phyzyme* (5000 FTU/ml). Verdun deze oplossing 1000 x met water (oplossing: 5 FTU/ml). Voeg hiervan 0.25 ml aan het mengsel toe.
3. Incubeer de mengsels gedurende 6 uur onder constant roeren bij kamertemperatuur
4. Neem na 6 uur twee monsters van 1 ml vanuit het vloeistof (laat deze even bezinken) en voeg 1 ml TCA (40%). Vortex kracht en centrifugeer de vloeistof gedurende 15 minuten bij 20000 g.
5. Breng het supernatant verkregen in stap 4 over in een eppendorf cupje. Bewaar deze oplossing onder gekoelde conditie.
6. Bepaal het gehalte aan P in het supernatant.
7. Centrifugeer het resterende mengsel na afloop van de incubatie bij 20000 g en verwijder het supernatant.
8. Breng het residu kwantitatief over in een gewogen schaalpje en droog het overnacht bij 70°C.
9. Weeg het schaalpje inclusie residu en bepaal in het residu het gehalte aan fytinezuur-P en anorganische P via de Megazyme methode.



---

## Bijlage 2 Protocol: Bepaling van de fytase activiteit

### **Protocol:**

Een geselecteerde groep grondstoffen worden met het onderstaande protocol geanalyseerd.

1. 1 gram van de te onderzoeken grondstof wordt gesuspendeerd in 50 ml 0.25 M Acetaat buffer pH 5.5 waarin natrium fytaat is opgelost (9.2 g/l).
2. Per serie wordt 0; 0.1 en 1.0 ml verdunde fytase oplossing aan 50 ml 0.25 M Acetaat buffer pH 5.5 waarin natrium fytaat is opgelost (9.2 g/l) toegevoegd. Deze oplossingen komen overeen met 0, 0.5 en 5 FTU.

*Uitgaande van 1 gram monster komen deze activiteiten overeen met 0; 500 FTU/kg en 5000 FTU/kg hetgeen de natuurlijke range in grondstoffen bestrijkt.*

3. Incubeer de mengsels gedurende 4 uur onder constant roeren bij kamertemperatuur
4. Neem na 1 en 4 uur, twee monsters van 1 ml vanuit het vloeistof en voeg 1 ml TCA (40%). Vortex kracht en centrifugeer de vloeistof gedurende 15 minuten bij 20000 g.
5. Breng het supernatant verkregen na stap 4 over in een eppendorf cupje. Bewaar deze oplossing onder gekoelde conditie.
6. Bepaal het gehalte aan P in het supernatant.

---

# Bijlage 3 Protocol: Bepaling van de effectiviteit van intrinsiek fytase

## **Protocol:**

Een beperkte groep van combinaties van grondstoffen zijn met het onderstaande protocol geanalyseerd.

Protocol:

1. 0.5 gram van de te onderzoeken grondstof (fytinezuur bron) en 0.5 gram van een grondstof (fytase) en 0 en 0.1 ml van de verdunde fytase oplossing wordt gesuspenderd in 25 ml 0.25 M Acetaat buffer pH 5.5.
2. 1.0 gram van de te onderzoeken grondstof (fytate bron) en 0 en 0.1 ml van de verdunde fytase oplossing wordt gesuspenderd in 25 ml 0.25 M Acetaat buffer pH 5.5.
3. 1.0 gram van de te onderzoeken grondstof (fytase bron) en 0 ml van de verdunde fytase oplossing wordt gesuspenderd in 25 ml 0.25 M Acetaat buffer pH 5.5.
3. Incubeer de mengsels gedurende 2 uur onder constant roeren bij kamertemperatuur (*Hiermee worden de condities in de praktijk benaderd*)
4. Neem na , 2 uur twee monsters van 1 ml vanuit het vloeistof en voeg 1 ml TCA (40%). Vortex kracht en centrifugeer de vloeistof gedurende 15 minuten bij 20000 g.
5. Breng het supernatant verkregen na stap 4 over in een eppendorf cupje. Bewaar deze oplossing onder gekoelde conditie.
6. Bepaal het gehalte aan P in het supernatant.

Berekening:

P beschikbaarheid:

Fytinezuur bron:  $(\text{gehalte P in supernatant (mg/l)} * 2 * 0.025) / (\text{inweeg (g)} * \text{gehalte P (g/kg)}) * 100 \%$

Waarin 2 is verdunningsfactor en 0.025 is buffervolume in l.

Voor Sojaschilfers:

P in supernatant : 28.9 mg/l ; inweeg : 1.0013 ; gehalte : 6.1 g/kg →

Beschikbaarheid is 23.6 %

Fytase bron:  $(\text{gehalte P in supernatant (mg/l)} * 2 * 0.025) / (\text{inweeg (g)} * \text{gehalte P (g/kg)}) * 100 \%$

Waarin 2 is verdunningsfactor en 0.025 is buffervolume in l.

Voor Rogge:

P in supernatant : 74.8 mg/l ; inweeg : 1.0041 ; gehalte : 3.8 g/kg →

Beschikbaarheid is 98 %

Fytinezuur bron na toevoeging van fytase bron :

Fytinezuur bron:  $(\text{gehalte P in supernatant (mg/l)} * 2 * 0.025) - (\text{inweeg fytasebron (g)} * \text{gehalte P in fytasebron (g/kg)} * (\text{beschikbaarheid fytasebron (\%)/100})) * 100 / (\text{inweeg fytinezuur bron (g)} * \text{gehalte P fytinezuurbron (g/kg)}) * 100 \%$

Voor sojaschilfers in combinatie met rogge:

P in supernatant : 63.6 ;

Sojaschilfers: inweeg = 0.5001 g en gehalte = 6.1 g/kg

Rogge : inweeg = 0.5003 g, gehalte = 3.8 g/kg en beschikbaarheid = 98%

P beschikbaarheid (sojaschilfers) is 43.6 %

---

## Bijlage 4 Protocol: Pepsine-HCl bestendigheid van intrinsiek fytase

### **Protocol:**

Een beperkte groep van combinaties van grondstoffen zijn met het onderstaande protocol geanalyseerd.

Protocol:

1. 0.5 gram van de te onderzoeken grondstof (fytaat bron) en 0.5 gram van een grondstof (fytase) wordt gesuspenderd in 25 ml zoutzuur oplossing (pH 2) en 0.5 ml pepsine oplossing (1 g pepsin (2000FIP-U/g; Merck 7190) in 100 ml 0.2 M HCl) (met pepsine-HCl incubatie).
2. 0.5 gram van de te onderzoeken grondstof (fytaat bron) en 0.5 gram van een grondstof (fytase) wordt gesuspenderd in 25 ml water (zonder pepsine-HCl incubatie)
3. Het mengsel wordt gedurende 1 uur geïncubeerd bij 37°C.
4. Neutraliseer de pH2-monsters met 0.25 ml 1M NaOH.
5. Voeg 25 ml 0.25 M Acetaat buffer pH 5.5 toe en breng de pH tussen 5.45 en 5.55.
6. Incubeer de mengsels gedurende 2 en 6 uur onder constant roeren bij kamertemperatuur.
5. Neem na de incubatie van 1 ml vanuit het vloeistof en voeg 1 ml TCA (40%). Vortex kracht en centrifugeer de vloeistof gedurende 15 minuten bij 20000 g.
6. Breng het supernatant verkregen na stap 5 over in een eppendorf cupje. Bewaar deze oplossing onder gekoelde conditie.
7. Bepaal het gehalte aan P in het supernatant.

Berekening

P-beschikbaarheid (in %) =

$(\text{gehalte P in supernatant (mg/l)} * 2 * 0.050) / (\text{inweeg fytinezuur bron (g)} * \text{gehalte P fytinezuur bron (g/kg)} + \text{inweeg fytase bron (g)} * \text{gehalte P fytase bron (g/kg)}) * 100\%$

To explore  
the potential  
of nature to  
improve the  
quality of life



---

Wageningen Livestock Research  
Postbus 338  
6700 AH Wageningen  
T 0317 48 39 53  
E [info.livestockresearch@wur.nl](mailto:info.livestockresearch@wur.nl)  
[www.wur.nl/livestock-research](http://www.wur.nl/livestock-research)

---

Wageningen Livestock Research ontwikkelt kennis voor een zorgvuldige en renderende veehouderij, vertaalt deze naar praktijkgerichte oplossingen en innovaties, en zorgt voor doorstroming van deze kennis. Onze wetenschappelijke kennis op het gebied van veehouderijsystemen en van voeding, genetica, welzijn en milieu-impact van landbouwhuisdieren integreren we, samen met onze klanten, tot veehouderijconcepten voor de 21e eeuw.

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen UR bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van stichting DLO en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.000 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen UR wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

