Afd. Akkerbouw

VERSLAG 81.63 Pr.nr. 505.2090

Onderwerp: Bepaling van in vitro verteerbaar ruw zetmeel.

Bijlagen: Bijlage I en grafiek I

Verzendlijst: direkteur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afdeling Akkerbouw (5x), Normalisatie (Humme), projectbeheer

8163

Afdeling Akkerbouw

VERSLAG 81.63 Pr.nr. 505.2090

Project: Normalisatie/harmonisatie van onderzoek methoden voor diervoeders

Onderwerp: Bepaling van in vitro verteerbaar ruw zetmeel

Bijlagen: Bijlage I en grafiek I

Doel:

Onderzoek naar de invloed van enkele faktoren die een rol spelen bij de bepaling van in vitro verteerbaar ruw zetmeel.

Samenvatting:

De invloed werd onderzocht van de maalprocedure; de deeltjesgrootte; de enzymactiviteit en van pectine als storende component.

Conclusie:

De wijze van malen met een kruisslagmolen had geen invloed op de resultaten daar de warmteontwikkeling bij deze molen minimaal is. De deeltjesgrootte daarentegen heeft een belangrijke invloed op de resultaten van de bepaling.

De enzymactiviteit is eveneens bepalend voor het eindresultaat. Pektine wordt deels meebepaald bij de pancreatinemethode. Voor pektinehoudende grondstoffen is de pancreatinemethode derhalve niet bruikbaar voor de bepaling van zetmeel.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse

Medewerkers/Samenstellers: M.L. Essers, L.M.H. Frijns

Invloed malen en deeltjesgrootte op de bepaling

Bepaling totaal en verteerbaar zetmeel m.b.v. pancreatine in mais welke op verschillende manieren gemalen en in fracties verdeeld werd.

Doel:
Welke invloed hebben de manier van malen en de deeltjesgrootte op de bepaling van zetmeel m.b.v. pancreatine.

Methoden:
Voor de bepaling van zetmeel werd de ontwerp methode van de Ned. Normalisatie werkgroep "Koolhydraten in diervoeders" W.G. 370.10.005 gebruikt (zie bijlage I).

Conclusie:
Voor het gehalte totaal zetmeel heeft de manier van malen en de deeltjesgrootte weinig of geen invloed.

Voor het gehalte verteerbaar zetmeel heeft de deeltjesgrootte veel invloed. Hoe groter de fijnheid des te hoger is het gehalte verteerbaar zetmeel.

Analysemonsters

	Monster
Mais gemalen over 1 mm en verdeeld	
over twee fracties t.w. > 0,5 mm	A
⩽ 0,5 mm	B
mais gemalen over 1 mm	C
mais gemalen over 0,5 mm	D
mais gebroken (zonder zeef) en gemalen over 1 mm	E.

De fijnheidsverdelingen van de monsters C en E zijn weergegeven in grafiek I en zijn nagenoeg gelijk. Voor doorvalpercentages zie onderstaande tabel.

maaswijdte mm	monster C % doorval	monster E % doorval
0,08	11,4	5,8
0,2	28,4	--
0,25	--	40,8
0,3	41,9	--
0,335	51,0	58,4
0,5	73,7	78,1
0,63	93,9	99,1
0,8	100	100
1,0	100	100

analyse-resultaten	A	B	C	D	E
% ruw totaal zetmeel (D.S.)	80,6	76,9	76,9	77,2	76,6
glucosegehalte na inversie uitgedrukt in % zetmeel (D.S.)	72,3	68,7	69,7	68,4	--
% verteerbaar zetmeel (D.S.)	--	--	52,6	64,0	52,4
verteringscoefficient	--	--	68,4	82,9	68,4
% vocht	12,2	12,2	12,1	11,9	11,7
% ruw eiwit	9,10	8,85	8,65	9,15	--
% ruwe celstof	1,74	1,77	1,74	1,74	--

Het gebruikte enzym was van Merck (7133).

Invloed enzym op de bepaling

Aktiviteitsbepaling van amylase in pancreaspoeder.

De aktiviteit werd bepaald, volgens de methode van de werkgroep (zie bijlage I punt 6.6.1), in drie monsters pancreaspoeder t.w.:
A provimi (poeder afkomstig van organon 17-2-81)
B pancreatine B.P. van organon
C pancreatine van Merck (7133).

De resultaten uitgedrukt in eenheden per mg enzym.
A: 53
B: 16
C: 48

Pancreatine BP is ongeschikt gebleken voor de zetmeelanalyse daar het een hoge blancowaarde heeft nl. 266 mg glucose volgens Luff tabel per 400 mg enzym (enzymatisch 125 mg glucose/400 mg).

Invloed pektine op de bepaling

Bepaling van zetmeel en suikers in drie pektine produkten m.b.v. AGS en Pancreatine.

Doel:
Nagaan of pektine wordt meebepaald bij de zetmeelbepaling m.b.v. Pancreatine.

Methode:
Zetmeelbepaling m.b.v. Pancreatine exclusief alcoholextractie volgens werkgroep methode (bijlage I punt 8.2).
Zetmeelbepaling m.b.v. AGS inclusief alcoholextractie volgens intern voorschrift. In alcoholextract werd glucose, fructose, saccharose, lactose en dextrinen-maltose bepaald.

Conclusie:
Met de pancreatine methode wordt pektine grotendeels (in het onderhavige onderzoek 34%) meebepaald. Derhalve is de pancreatine methode niet toepasbaar voor de bepaling van zetmeel in pektinehoudende produkten.

Resultaten:

		Pektin A	Pektin B	Apfelpektin
% zetmeel m.b.v.	AGS/HK	11,31	8,73	3,77
	Pancreatine	47,55	45,61	40,61
bijdrage van pektine		34,36	33,38	33,88
% in alcoholextract	glucose	--	0,31	0,55
	fructose	--	0,51	0,23
	saccharose	--	0,17	0,17
	lactose	--	--	--
	dex-maltose (berekend als zetmeel)	1,88	2,57	2,08

Pektin A : aus äpfeln veresterungsgrad ca. 10% (9122)
Pektin B : aus äpfeln veresterungsgrad ∽ 72-75% (8909)
Apfelpektin: nahezu stärkefrei pharm. veresterungszahl ∽ 38% (4509).

De drie pektinen waren afkomstig van Carl Roth D 7500 Karlsruhe 21.

Bespreking van de resultaten:

Pektine is een wateroplosbaar polysaccharide voornamelijk van het type 1 - 4 β galacturonzuur. Verwacht mag worden dat de α specifieke enzymen amyloglucosidase en α amylase de pektine niet afbreken.
De enzymatische eindbepaling van glucose bij de zetmeelbepaling met AGS maakt deze zetmeelbepalingsmethode eens te meer ongevoelig voor de aanwezigheid van pektine. De gevonden gehalten aan zetmeel in de pektine monsters m.b.v. AGS/HK worden dan ook beschouwd als zijnde onverdacht.
De gehalten aan zetmeel bepaald m.b.v. pancreatine worden daarentegen verkregen na een weliswaar specifieke hydrolyse van 1 - 4 α glucanen, doch deze wordt gevolgd door een a-selectieve (zwakke) hydrolyse met zoutzuur en een a-selectieve reductometrische titratie volgens Luff-Schoorl. Uit het verschil tussen beide analysemethoden is daardoor de bijdrage van pektine aan het zetmeelgehalte dat wordt gevonden m.b.v. pancreatine te berekenen. Berekening: zetmeel m.b.v. pancreatine - zetmeel m.b.v. AGS/HK - suikers van het alcoholextract omgerekend tot zetmeel = bijdrage van de pektine aan het zetmeelgehalte m.b.v. pancreatine. Voor de drie pektinesoorten wordt dan gevonden:

pektin A : 34,36
pektin B : 33,38
apfelpektin: 33,88.

bijlage I

BEPALING VAN DE IN VITRO VERTEERBAARHEID VAN RUW ZETMEEL

1. Onderwerp.

Deze norm beschrijft een methode voor de bepaling van de in vitro verteerbaarheid van ruw 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 verteerbaar ruw zetmeel: de hoeveelheid zetmeel en hoogmoleculaire afbraakprodukten hiervan die - zonder voorbewerking - door α-amylase wateroplosbaar gemaakt kunnen 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 glukose-equivalenten, vermenigvuldigd met 0,9 zoals bepaald in de hieronder beschreven methode en uitgedrukt in procenten van het in behandeling genomen monster.
De in vitro verteerbaarheid is het gehalte in vitro verteerbaar ruw zetmeel gedeeld door het gehalte totaal ruw zetmeel en vermenigvuldigd met 100 %.

4. Beginsel

Het monster wordt geïncubeerd met pancreaspoeder. Het daarin aanwezige enzym amylase breekt zetmeel af tot water-oplosbare 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 ruw zetmeel.

5. Bereid het analysemonster door eerst vóór te breken in een kruisslagmolen zonder zeef en vervolgens te malen over een 1 mm zeef.

6. Reagentia en hulpstoffen

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

6.1. Buffer/zoutoplossing, pH 6,8. Los daartoe 7,262 g kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4), 9,500 g dinatriumwaterstoffosfaat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) en 1,868 g NaCl op in 1 l water.

6.2. Klaringsoplossingen volgens Carrez:

6.2.1. Carrez-I: Los 21,9 g zinkacetaat ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) en 3 g ijsazijn op in water en vul aan tot 100 ml.

6.2.2. Carrez-II: Los 10,6 g kaliumhexacyanoferraat (II) ($K_4Fe(CN)_6.2H_2O$) op in water en vul aan tot 100 ml.

6.3. NaOH 4 m en 10 m.

6.4. HCl 25 % en 4 m.

6.5. Fenolftaleïne-indicator (1 g/l)

6.6. Pancreaspoeder of pancreatine

6.6.1. Bepaling van de aktiviteit van amylase in pancreaspoeder.
Weeg 200 mg pancreaspoeder af in een maatkolf van 1 l. Voeg gedestilleerd water toe en homogeniseer. Vul verder aan tot de maatstreep en homogeniseer de suspensie opnieuw.
Verdun een deel van de buffer-zoutoplossing met water in een verhouding 1 : 1. Plaats de verdunde buffer-zoutoplossing in een waterbad van 40 °C. Maak een oplossing van zetmeel volgens Zulkowski (3 g/100 ml). Plaats deze eveneens in het waterbad.

Breng in een maatkolf van 100 ml achtereenvolgens 10 ml vóórverwarmde zetmeeloplossing en 50 ml voorverwarmde buffer-zoutoploosing. Pipetteer daarin 1 ml pancreatine-oplossing, na de suspensie nog eens omgeschud te hebben. Druk de stopwatch direkt na het pipetteren in, schud de kolf krachtig om en plaats hem in het waterbad.
Stop de reaktie na precies 30 min. door toevoeging van 5 ml Carrez-I-oplossing. Schud krachtig gedurende 1 min. Breng de kolf over in een koud waterbad. Voeg daarna 5 ml Carrez-II-oplossing toe. Schud weer 1 min. Laat de oplossing verder afkoelen en neutraliseer daarna met 4 m NaOH op fenolftaleïne tot lichtrose. Voeg druppelsgewijs 25 % HCL-oplossing toe tot omslag naar kleurloos en dan nog twee druppels extra. Vul de maatkolf aan tot de maatstreep, homogeniseer de inhoud en filtreer over een vouwfilter. Ver-

werp het eerste deel van het filtraat en pipetteer vervolgens uit het heldere filtraat 25 ml voor een Luff-Schoorl-bepaling. Voer de complete bepaling in duplo uit. Voer tevens een blanko uit met zetmeel vlgs. Zulkowski en geïnaktiveerd enzym na ca. 50 ml pancreatine-oplossing gedurende 10 min. gekookt te hebben (zowel het enzym als het zetmeel vlgs. Zulkowski kan reducerende equivalenten bevatten). Gebruik door de Luff-Schoorl titratie de maltose-tabel.

Berekening

Het aantal eenheden per mg is $\frac{4 \cdot 10^3 \cdot m}{0{,}2 \cdot 342 \cdot 30}$, is $\frac{m}{0{,}513}$

waarin:

m = het aantal mg maltose volgens de Luff-Schoorl tabel, overeenkomend met (b-a) ml, als b het aantal ml verbruikte thio bij de blanko bepaling en a het aantal ml bij de bepaling van het monster is.

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. Verdun een deel van de buffer-zoutoplossing (6.1) met water in een verhouding 1 : 1. Laat de verdunde buffer-zoutoplossing in een waterbad van 40 °C ± 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 100 ml. Voeg hieraan 50 ml van de voorverwarmde buffer-zoutoplossing toe.
Incubeer het mengsel in het waterbad onder voortdurende beweging gedurende 60 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 25 % HCl-oplossing toe tot omslag naar kleurloos 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 maatkolf van 100 ml. Voeg 3 ml 25 % HCl-oplossing toe, plaats een luchtkoeler van ca. 1 m lengte op de maatkolf en kook gedurende 1½ uur. Laat de oplossing afkoelen, neutraliseer met 10 m NaOH tot licht-rose en vervolgens met 4 m HCl tot kleurloos.
Vul de maatkolf met water aan tot de maatstreep. Homogeniseer en bepaal de hoeveelheid glukose volgens Luff-Schoorl in 25 ml, zoals beschreven in NEN 3574. Voer een blanko bepaling uit door aan 400 mg pancreatine 50 ml voorverwarmde buffer/zoutoplossing toe te voegen en verder te werken volgens bovenbeschreven wijze.

8.2. Voer een bepaling van totaal ruw zetmeel uit.
Weeg 1,0 g monster op 1 mg nauwkeurig af in een maatkolf van 100 ml. Voeg 30 ml water toe. Schud, om een zo regelmatig mogelijke verdeling van het monster te verkrijgen, de kolf krachtig om. Plaats de kolf ca. 5 min. in een kokend waterbad en houd daarbij de inhoud voortdurend in beweging. Zet, nadat een zo goed mogelijke verdeling van het monster is bereikt, de maatkolf in een autoclaaf of hogedrukpan en verhit gedurende 2 uur bij 120 °C en een overdruk van 100 kPa ($\approx$ 1 atm) of 1 uur bij ca. 130 °C en een overdruk van 180 kPa ($\approx$ 1,8 atm).
Neem de maatkolf uit de autoclaaf. Koel af en voeg 400 mg pancreatine toe. Voeg 30 ml onverdunde buffer/zoutoplossing toe (6.1), op zodanige wijze, dat eventueel zich in de hals van de kolf bevindende pancreatine naar beneden wordt gespoeld. Incubeer het mengsel in een schudwaterbad gedurende 60 min. en voer de bepaling verder uit, zoals beschreven onder 8.1.

9. Berekening

Bereken het gehalte aan in vitro verteerbaar ruw zetmeel uit:

$$W = \frac{0{,}9\ (a - b)\ .\ 10\ .\ 10^2\ .\ 10^2}{2{,}5\ .\ V.m.10^3} = \frac{36\ .\ (a - b)}{V.m.}$$

waarin: W is het gehalte aan in vitro verteerbaar ruw zetmeel, in % (m/m);
a en b zijn respektievelijk de afgelezen hoeveelheden glukose uit de tabel voor de bepaling en de blanko;
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 ruw zetmeel, waarbij dezelfde blanko waarde gebruikt kan worden.
Als W het gehalte aan in vitro verteerbaar zetmeel en T dat aan totaal zetmeel is, dan is $\frac{W}{T}$ x 100 de in vitro verteringscoëfficiënt.

grafiek I

• maïs gebroken (zonder zeef) en gemalen over 1 mm

□ maïs gemalen over 1 mm



DIN A 4 210x297mm