

MÓDSZER A KEMÉNYÍTŐ ALFA-AMILÁZOS HOZZÁFÉRHETŐSÉGÉNEK A MEGHATÁROZÁSÁRA TAKARMÁNYOKBAN

MÁTRAI TIBOR — KÓKAI MIKLÓSNÉ — HERMÁN ISTVÁNNÉ —
SALAMON JÓZSEFNÉ — ERDÉLYI ISTVÁN

ÖSSZEFOGLALÁS

A takarmányiparban, az alapanyagok és a takarmánykeverékek hőkezelésének célja a keményítő zselatinizálása a pellettáláshoz, de emellett magasabb csiraszámú alapanyag sterilizálása és/vagy az emészthetőségi mutatók javítása.

A natív keményítőszemcsét az alfa-amiláz csak lassan bontja glukózzá. Gőzközegű (hidrotermikus) hőkezelés hatására a keményítő, amilázzal, annak arányában már gyorsabban bontható, míg teljesen felfőzött, "oldott" állapotban az alfa-amiláz tetemes reakciósebességgel bont. Hőkezelt takarmánymintában lévő keményítő alfa-amilázos hozzáférhetősége tehát a hőkezelttség alkalmas mutatója lehet.

A keményítő amilázos bonthatóságának mérésére az eddig közreadott módszerek munkaigényesek és bonyolultak.

A szerzők, a takarmányminta őrleményének vizes szuszpenzióját, 7,6 pH-jú pufferban, 37 °C-on, bakteriális alfa-amilázzal rázatva inkubálták. A 30. perc után, az inkubált elegyben, a felszabadult glukóz koncentrációját mérték. Egyidejűleg, azonos mintát, szuszpenzióban forraltak 20 percig, majd ezután amilolizáltatták a fenti feltételek mellett, majd ugyancsak a 30. perc után, a glukóz koncentrációját mérték. A mintában mérhető glukóz-felszabadulás mértékét, a forralt mintára kapott érték százalékában fejezték ki. Ez az alfa-amilázos bonthatóság (AMAV, %) százalékos mérőszáma, ami kifejezi, hogy mekkora a vizsgált minta aktuális feltártsága, ugyanazon minta vizes közegű kezeléssel elérhető maximális feltártságához képest.

A módszerrel kezeletlen, pellettált és expandertel is hőkezelt indító, nevelő és befejező pulyka-takarmánysorok amilázos hozzáférhetőségét (AMAV, %) állapították meg.

SUMMARY

Mátrai, T. – Kókai, M.-né Ms. – Hermán, I.-né Ms. – Salamon, J.-né Ms. – Erdélyi, I.: METHOD FOR THE DETERMINATION OF ALFA-AMYLASE AVAILABILITY OF THE STARCH IN FEED

Heat treatment of the feed is used basically to promote the gelatinization of the starch prior to the pelleting process. In addition, higher germ count can be reduced and/or improvement in nutrient availability can be expected.

Alpha-amylase can split glucose from native starch particles only rather slowly. If starch has been cooked or submitted to steaming (hydrothermic) treatment, the split off is faster, while with thoroughly boiled ("solubilized") starch the alpha-amylase is acting with a considerable speed. Thus the amylolytic availability in a feed sample may serve as an indicator to the extent of hydrothermal treatment.

Methods having been recommended for the determination of amylolytic availability of starch are time consuming and need much labor.

According to the method proposed by the authors, ground feed sample suspended in pH 7.6 buffer was incubated at 37 °C and shaken with bacterial alpha amylase. At the 30 min. of incubation aliquot was taken from the incubated system and the concentration of deliberated glucose was determined. Simultaneously, another sample of the same feed was first boiled for 20 min., then amylolysed under the same conditions. The extent of glucose deliberation in the sample was expressed as percent of the glucose deliberated in the pre-boiled sample. This is the percentual value of the actual amylolytic availability (AMAV, %) of starch in the sample, related to that in the sample having been completely opened up. By using this method, amylolytic availability (AMAV, %) in untreated, pelleted and expanded starter, grower and finisher turkey feeds were determined.

BEVEZETÉS

A takarmányiparban terjedő eljárás az alapanyagok és a takarmánykeverékek hőkezelése. Ennek célja a keményítő zselatinizálása a pellettáláshoz, de emellett magasabb csiraszámú alapanyag sterilizálása és/vagy az emészthetőségi mutatók javítása.

Keményítő a gabonamagvakban mikroszkópikus szemcsék alakjában fordul elő. Az érett magban jóformán vízmentes állapotban van. Óriásmolekulái a növényfajra jellemző alakú szemcsékbe rendeződnek.

A keményítőszemcse hevítve jelentős mennyiségű vizet képes felvenni, majd hosszabb főzésre, a kristályszerű szerkezet felbomlik, zselatinizálódik, végül az óriásmolekulák vizes oldatba kerülnek.

A természetes állapotú (natív) keményítőszemcsét az alfa-amiláz csak lassan bontja glukózzá. Vizes közegben, hőkezelés hatására (hidrotermikus hatás), a keményítő jóval gyorsabban bontható, míg a teljesen felfőzött, "oldott" állapotban, az alfa-amiláz tetemes reakciósebességgel bont.

Mint ahogy az egygyomrú háziállatok emésztése során a keményítő a vékonybélben, a pankréász alfa-amilázának hatására glukózzá bomlik, és ebben az alakban szívódik fel, feltehető az is, hogy a keményítő alfa-amilázos bonthatóságának (hozzáférhetőségének) a takarmányhasznosításban szerepe van.

Széleskörű gyakorlati tapasztalatok bizonyították, hogy a hőkezelt takarmányokkal jobb eredmények érhetők el, mint a kezeletlenekkel, az egygyomrúakkal és a kérődzőkkel egyaránt.

Ennek ellenére, a takarmányiparban és a takarmányvizsgálatban, az amilázos hozzáférhetőséget nem vizsgálják, erre nézve rutinmódszer sem forog köz-kézen.

Az eddig közreadott módszerek a hőkezelt kukorica és a cirok vizsgálatára irányultak.

Számos módszer-ajánlás közül kiemelhető *Xiong és mtsainak* (1990a) többszörösen javított módszere. Ebben az amilázos glukóz-lehasítás idősoros görbét viszonyítják a termék teljes glukóztartalmához. Az eljárás során, az enzim/szubsztrát rendszerből nagyszámú glukóz-mérést kell végezni. Ez felesleges, ugyanis a bontási görbék lefutása, alacsony és magas feltártság esetén is párhuzamos, tehát egy vagy két bontási időpont adata elegendő.

Lényegében *Xiong* módszerére alapít *Meilahn és Brown* (2001) szabadalma, ami az amerikai mezőgazdasági laboratóriumok által bevezetett és alkalmazott módszer.

Az enzimes módszer mellett más mérési elvekkel is kísérleteznek.

Optikai (reflexiós spektrometriai) mérési elven alapuló módszert szabadalmaztattak *Bachman és Hubbert* (1999) a kukorica hőkezelésének ellenőrzésére, amely lényegében a barnulási reakciók korai műszeres érzékelésén alapul.

Xiong és mtsai (1990b) szarvasmarha takarmányozására szánt cirokmag hőkezeltiségét, bendőlével inokulált mintaszuszpenzió gáztermelésén keresztül mérték.

Munkaigényességük mellett az eddig közreadott módszerek legfőbb fogyatéka, hogy amennyiben nem egyfajta terménymintát, hanem pl. takarmánykeverékeket hasonlítottak össze, az enzimatikusan lehasított glukóz-

menyiséget először a minta külön analízissel meghatározott keményítőtartalmával ekvivalens glukóztartalomhoz kellett viszonyítani.

Mindezek miatt nem érdektelen, a kezeletlen vagy hőkezelt takarmányok alfa-amilázos bonthatóságának *in vitro* mérésére, vagy sorozatvizsgálatra alkalmas olyan egyszerű módszert kidolgozni, ami a keményítőtartalom feltártági állapotát közérthetően fejezi ki.

Módszerünkben a mintának maximális hőkezelés utáni abszolút hozzáférhetőségéhez — mint a gyakorlatban elérhető maximumhoz — viszonyítunk. A minta hozzáférhetőségét ennek százalékában fejezzük ki. Erre az ad lehetőséget, hogy eléggé híg közegben, a teljesen feltárt és a kevésbé feltárt minta bontási görbéje párhuzamos lefutású.

Az amiláz-hozzáférhetőség (AMAV) tehát egy százalékos viszonyszám, ami kifejezi, hogy egy kezelt vagy kezeletlen mintából, időegység alatt, az amiláz hatására mennyi glukóz szabadul fel a 20 percg forralt, azaz a maximálisan előkezelt azonos minta bontásához képest (100%)

Ez a mérőszám arra is alkalmas, hogy valamilyen ipari hőkezelés (gőzölés a pelletálás előtt, száraz és nedves extrúzió, expandáltatás, stb.) eredményességét egyetlen biokémiai mutatóval jellemezzük.

A következőkben a laboratóriumunkban fejlesztett, könnyen kivitelezhető módszert közöljük.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

A mérés elve

A takarmányminta őrleményének vizes szuszpenzióját, 37 °C-on, bakteriális alfa-amilázzal rázatva inkubáljuk. A 30. perc után, az inkubált elegyben, a felszabadult glukóz koncentrációját mérjük. Egyidejűleg, azonos mintát, szuszpenzióban 20 percg forralunk, majd ezután amilolizáltatunk a fenti feltételek mellett, majd ugyancsak a 30. perc után, a glukóz koncentrációját mérjük. A 20 percg forralt mintában a glukózfelszabadulás üteme gyorsabb lesz. A mintában mérhető glukóz-felszabadulás mértékét a forralt mintára kapott érték százalékában fejezzük ki. Ez az alfa-amilázos bonthatóság mérőszáma, ami kifejezi, hogy mekkora a vizsgált minta aktuális feltártága, a hidrotermikus kezeléssel elérhető maximális feltártáshoz képest.

Kivitel

a) 1,00 g, 0,2 mm szemcseméretű mintaőrleményt, 20 ml, pH 7,6-os, 0,1 N foszfát pufferban, proteázmentes, 300 µg *Bacillus subtilis* alfa-amilázzal (NOVO), 30 percg, 37 °C-on, víztermosztátban rázatva bontatunk. Lényeges, hogy a felhasznált alfa-amiláz proteázokat ne tartalmazzon, mint általában a hasnyálmirigyből izolált készítmények, mert ebben az esetben az amiláz önméztésnek lehet kitéve. A használatra szánt enzimkészítményből a munkakonzentrációt 2-es alapú logaritmusok hígításokkal empirikusan állapíthatjuk meg. Az az enzimkoncentráció a megfelelő, amellyel a b) pont szerinti előforralt minta, 30 percg enzimmel inkubált reakcióelegyében, 0,10 ml alikvotban, a

glukóz jól mérhető, azaz a DSA reakció után 0,3–0,4 abszorbanciát kapunk. Az enzim/szubsztrát rendszerből a 0. és a 30. percben, 0,10 ml-es alikvotokat veszünk, a bontatást jeges vízben leállítjuk, és 0,10 ml DSA-reagenssel (Mátrai és mtsai, 2001) a felszabadult redukáló cukor abszorbanciáját (A(enzimmel)) 531 nanométeren mérjük. (A kapott abszorbanciákat felesleges glukóz-standard-sorhoz viszonyítva abszolút glukóz-koncentrációkban kifejezni.)

b) 1,00 g mintaörleményt 20 ml pH 7,6-os 0,1 N foszfát puffer vizes szuszpenziójában, 20 percig forralunk. Ezután az a) pontban leírtak szerint járunk el.

c) A takarmánymintákat, 20 perces forralást követően és forralás nélkül, a fenti körülmények között amiláz nélkül inkubáljuk, majd 30 perc után megmérjük a felszabadult glukóz abszorbanciáját (A(enzim nélkül)). Ez a mérés azt mutatja meg, hogy az inkubált elegyben enzim nélkül, a 30. percig mennyi redukáló cukor szabadult fel. Az enzim nélkül mérhető értékek a takarmány redukáló cukortartalmából, és az autochton (a gabonában eleve jelenlévő) és/vagy hozzáadott enzim-kiegészítések amilolitikus hatásából adódnak. Ezeket az (A) értékeket az enzimmel bontott értékekből, a számítás során, levonjuk.

d) Amennyiben a takarmány, keményítőtartalmához képest, jelentős mennyiségű redukáló cukrot tartalmaz, az inkubálás nélkül pufferban 10 percig rázatott elegy abszorbanciáját, az inkubált abszorbanciaértékekből le kell vonni.

Számítás

A 20 percig forralt minta maximálisan feltárt keményítőtartalmához viszonyítva, a százalékos hozzáférhetőséget, a 30. perc inkubálás után (AMAV %/37 °C, 30') az alábbi képlet szerint kaphatjuk meg:

$$\text{AMAV \%}, 30 \text{ perc} = \frac{A(1) - A(2)}{A(3) - A(4)}$$

ahol:

A(1)=a minta enzimmel való 30 perces inkubálása után kapott abszorbancia 531 nanométeren,

A(2)=a minta, enzim nélkül való 30 perces inkubálása után kapott abszorbancia,

A(3)=a 20 percig forralt minta enzimmel való 30 perces inkubálása után kapott abszorbancia,

A(4)=a 20 percig forralt minta enzim nélkül való 30 perces inkubálása után kapott abszorbancia.

Hibaforrások

Ügyelni kell arra, hogy a párhuzamosan vizsgált forralt és forralatlan mintákat ugyanolyan korú és tároltságú, azonos alfa-amiláz/puffer oldatban bontassuk. A hűtött tárolás során ugyanis, az enzim aktivitása csökkenhet az oldatban. Fontos még az azonos szemcseméret és az azonos intenzitású ráztatás.

Az enzim-szubsztrát rendszerből kivett alikvotok cukor meghatározásának reprodukálhatóságát nagyobb reakciótérfogatokkal (pl. 1,0+1,0 ml alikvotok), és a nagyobb alikvot-térfogat szűrésével fokozhatjuk.

A módszer reprodukálhatósága, ugyanazon minta többszöri egyidejű feldolgozásakor kapott adatok szórásából (1. táblázat) ítélhető meg.

1. táblázat

Ugyanazon minta 10 párhuzamos beméréséből 30 perces inkubálás után meghatározott amilázos hozzáférhetőségi értékek és szórásaik

	A (előforralt)(1)	A (minta)(2)	AMAV %
	0,421	0,100	23,7
	0,439	0,120	27,3
	0,392	0,135	34,4
	0,440	0,131	29,7
	0,496	0,156	31,4
	0,506	0,136	26,8
	0,449	0,132	29,3
	0,442	0,113	25,5
	0,442	0,131	29,6
	0,427	0,127	29,7
n	10	10	10
$\bar{x}$	0,445	0,128	28,7
SD	0,034	0,015	3,00
SD%	7,6	11,7	10,4

A=a felszabadult redukálócukor abszorbanciája(3)

Table 1.: Amylolytic availability values determined in 10 replications of the same feed sample, their mean and standard deviation
previously boiled(1), sample(2), absorbance of the reducing sugar deliberated(3)

A módszer hibája, a mintafeldolgozás és inkubálás, valamint a redukáló cukor-meghatározás hibáiból adódik össze. Ezeket a hibákat hordozza a számított százalékos hozzáférhetőségi adat. Az elvégzett replikációs sorozat adatai alapján, a módszerre jellemző SD% 10 relatív %-nak vehető. Hosszabb inkubációs idő esetén a párhuzamosok közötti SD% értéke rohamosan nő.

Eltérő hőhatásnak kitett takarmányminták vizsgálatával kapott eredmények

Egy összehasonlító takarmányozási kísérlet kapcsán, azonos takarmányösszetételekből (pulykaindító, -nevelő és -befejező) kezeletlen, granulált és expandált+granulált kukorica vagy búza bázison készült takarmányminták álltak rendelkezésünkre.

Kezeletlen, granulált, és expandált+granulált takarmánykeverékek keményítőtartalmának a maximálisan feltárt mintához viszonyított százalékos amilázos hozzáférhetőségét, 30 perces inkubálás után, az 1. ábra (búza bázison) és a 2. ábra (kukorica bázison) összesíti.

1. ábra: Különböző búza alapú pulykatápok amilázos hozzáférhetősége

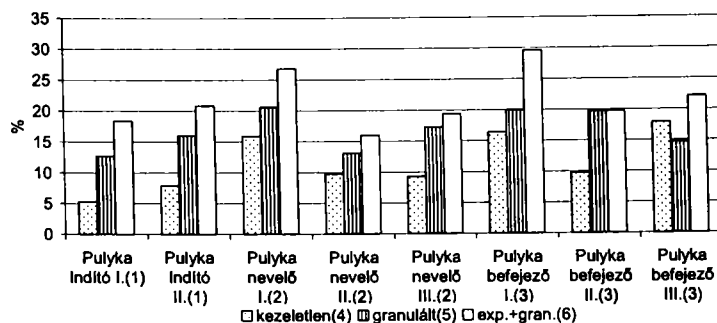


Fig. 1.: Amylolytic availability of different diets on wheat basis
 Turkey starter(1), Turkey grower(2), Turkey finisher(3), untreated(4), pelleted(5), expanded and pelleted(6)

2. ábra: Különböző kukorica alapú pulykatápok amilázos hozzáférhetősége

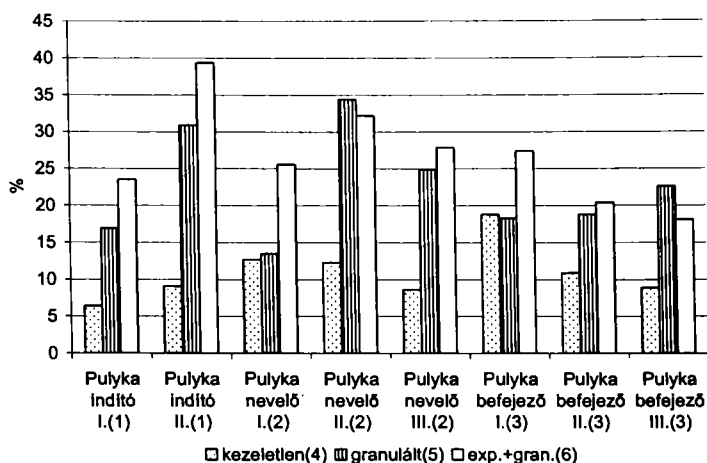


Fig. 2.: Amylolytic availability of different diets on maize basis
 as in Fig. 1.(1–6)

ÉRTÉKELÉS

A minták amilázos hozzáférhetősége, a hőkezelés hatására, annak intenzitása szerint általában nő. Amennyiben inkonzekvens összefüggéseket találunk, gondolni kell arra, hogy üzemi körülmények között, a berendezéseken belüli hőmérséklet, nyomás, és a vízkaktivitás monitoringja rendszerint csak névleges, így a közölt hőösszeget általában nem ismerik. A keményítő-hozzáférhetőség enzimes mérésében zavart okozhat a takarmánykeverékek 8–10%-nál maga-

sabb zsírtartalma is, mert a keményítőszemcse nedvesedését a rásült zsír csökkenti. Ilyenkor hexánnal extrahálni kell. A búzas tápok hozzáférhetősége, a hőkezelések függvényében valamivel jobban növekszik, mint a kukoricás tápoké.

A módszer ebben a formájában alkalmas arra, hogy mintasorozatokban a hőkezelés tényét és mértékét jelezze, akár üzemi laboratóriumokban is.

IRODALOM

- Bachman, S.E. – Hubbert, M.E.(1999): Optical method to monitor the processing of a starch containing material. US Patent, 6573994
- Mátrai, T. – Mayer, Zs. – Kókai, Zs. – Salamon, I.(2000): Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of 2001 *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*. Int. J. Food Microbiol., 61. 187–191.
- Meilahn, M.K. – Brown, D.R.(2001): Method for measuring processing degree and gelatinized starch content of steam-flaked corn and other grains. US Patent, 6326043
- Xiong, Y. – Bartle, S.J. – Preston, R.L.(1990a): Improved enzymatic method to measure processing effects and starch availability in sorghum grain. J: Anim. Sci., 68. 11. 3861–3870.
- Xiong, Y. – Bartle S.J. – Preston, R.S. – Meng, Q.(1990b): Estimating starch availability and protein degradation of steam flaked a reconstituted sorghum grain through a gas production technique. J. Anim. Sci., 68. 3880–3885.

Érkezett: 2008. január

Szerzők címe: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet

Authors' address: Research Institut for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.