	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10100.1 - Stanovení aktivity fytázy	Revize	0

## STANOVENÍ AKTIVITY FYTÁZY

### 1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje stanovení fytázové aktivity ve vzorcích krmných směsí, minerálních krmiv a premixů. Metodou se nestanoví rozdíl mezi fytázou přidanou do krmiv a fytázou endogenní, už přítomnou v krmivu.

### 2 Princip

Fytáza uvolňuje fosfát ze substrátu myo-inositol-hexafosfátu (fytátu). Uvolněný anorganický fosfát vytváří s kyselým molybdenan/vanadičnanovým činidlem žlutý komplex. Tento komplex se měří při vlnové délce 415 nm a množství uvolněného anorganického fosfátu se stanoví metodou kalibrační křivky.

Fytázová jednotka (U) je množství enzymu, které za 1 min uvolní 1  $\mu\text{mol}$  anorganického fosfátu za reakčních podmínek udávaných v této metodě.


### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak. Voda čistá (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).


- 1 Amoniak,  $\text{NH}_3$ , roztok 25%.
- 2 Heptamolybdenan amonný tetrahydrát,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .
- 3 Vanadičnan amonný;  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ .
- 4 Kyselina chlorovodíková,  $\text{HCl}$ , 35%,  $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$ .
- 5 Kyselina chlorovodíková,  $\text{HCl}$ , 25%.

Příprava: 2,5 dílu kyseliny chlorovodíkové 35% (4) se ředí do 1 dílu vody. Uchovává se při laboratorní teplotě.

- 6 Kyselina dusičná,  $\text{HNO}_3$ , 65%.
- 7 Dihydrogenfosforečnan draselný,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- 8 Fytát sodný,  $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_{12}\text{O}_{24}\text{P}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  z rýže (např. Sigma®PO109). Fytát sodný je při skladování v lednici stálý přibližně 2 až 3 měsíce. Po 2 měsících skladování je třeba před analýzou ověřit, zda nedochází k jeho rozkladu.
- 9 Octan sodný trihydrát,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .
- 10 Tween® 2010.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10100.1 - Stanovení aktivity fytázy	Revize	0

- 11 Kyselina dusičná, HNO<sub>3</sub>, ředěná.  
Příprava: 1 díl kyseliny dusičné 65% (6) se ředí do 2 dílů vody. Uchovává se při laboratorní teplotě.
- 12 Molybdenanové činidlo.  
Příprava: 100,0 g heptamolybdenanu amonného tetrahydrátu (2) se rozpustí v asi 800 ml vody. Přidá se 10 ml roztoku amoniaku (1) a doplní se vodou do 1000 ml. Uchovává se při laboratorní teplotě ve tmě nejdéle 2 měsíce.
- 13 Vanadičnanové činidlo.  
Příprava: 2,35 g vanadičnanu amonného (3) se rozpustí v přibližně 400 ml vody o teplotě 50 °C až 60 °C. Přidá se 20 ml naředěné kyseliny dusičné (11) a doplní se vodou do 1000 ml. Uchovává se při laboratorní teplotě ve tmě nejdéle 2 měsíce.
- 14 Molybdenan/vanadičnanové (STOP) činidlo.  
Příprava: Smíchá se 1 díl vanadičnanového činidla (13) s 1 dílem molybdenanového činidla (12) a přidají se 2 díly naředěné kyseliny dusičné (11). Promíchá se. Přípravuje se denně čerstvý.
- 15 Tween® 20, 10%.  
Příprava: 10,0 g Tweenu (10) se rozpustí ve vodě a doplní se na 100 ml. Uchovává se při laboratorní teplotě nejdéle 6 měsíců.
- 16 Acetátový pufr, pH 5,5; 0,25 mol/l.  
Příprava: 34,0 g octanu sodného (9) se rozpustí v přibližně 900 ml vody. pH se upraví kyselinou chlorovodíkovou (5) na hodnotu 5,50 ± 0,02 a doplní se vodou do 1000 ml. Uchovává se při laboratorní teplotě nejdéle 2 týdny.
- 17 Acetátový pufr s 0,01% Tweenem 20, pH 5,5; 0,25 mol/l.  
Příprava: 34,0 g octanu sodného (9) se rozpustí v asi 900 ml vody. pH se upraví kyselinou chlorovodíkovou (5) na hodnotu na 5,50 ± 0,02. Přidá se 1 ml 10% Tweenu (15) a doplní se do 1000 ml vodou. Uchovává se při laboratorní teplotě nejdéle 2 týdny.
- 18 Acetátový pufr s 0,01% Tweenem 20, pH 5,5; 0,50 mol/l.  
Příprava: 68,0 g octanu sodného (9) se rozpustí v přibližně 900 ml vody. pH se upraví kyselinou chlorovodíkovou (5) na 5,50 ± 0,02. Přidá se 1 ml 10% Tweenu (15) a doplní se vodou do 1000 ml. Uchovává se při laboratorní teplotě nejdéle 2 týdny. Používá se místo acetátového pufru (17) v případě, kdy aktivita fytázy ve vzorku je ≤ 200 U/kg.
- 19 Fytátový substrátový roztok, 7,5 mmol/l, konečná koncentrace v reakci 5 mmol/l.  
Příprava: 2,00 g fytátu sodného (8) s obsahem anorganického fosforu ≤ 0,1 % se rozpustí v asi 200 ml acetátového pufru (16). Přesná navážka se stanoví s ohledem na čistotu a obsah vody v dané šarži (viz. poznámka 7). pH se upraví kyselinou chlorovodíkovou (5) na hodnotu 5,50 ± 0,02 a doplní se acetátovým pufrem (16) do 250 ml. Přípravuje se denně čerstvý, než se upotřebí, uchová se v lednici.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10100.1 - Stanovení aktivity fytázy	Revize	0

20 Standardní fosfátový zásobní roztok, 200 mmol/l.

Příprava: Asi 10 g dihydrogenfosforečnanu draselného (7) se vysuší 2 h při 105 °C a uchová se v exsikátoru.

Naváží se přibližně 2,722 g vysušeného dihydrogenfosforečnanu draselného (7) (přesná navážka se zaznamená pro výpočty), kvantitativně se přeneso do 100ml odměrné baňky a doplní se do 100 ml acetátovým pufrům s Tweenem 20 (17). Následně se promíchá třepáním do úplného rozpuštění dihydrogenfosforečnanu. Uchovává se při laboratorní teplotě nejdéle 2 týdny.

21 Standardní fytázový zásobní roztok.

Podle očekávané aktivity fytázy se naváží (50,0 – 300,0) mg certifikovaného fytázového standardu (22), kvantitativně se přeneso do 100ml odměrné baňky a doplní se na 100 ml acetátovým pufrům s Tweenem 20 (17). Následně se promíchá třepáním do úplného rozpuštění fytázy. Přípravuje se denně čerstvý.

22 Certifikovaný standard fytázy, např. Basf, kat. č. A009/001/Standard.

23 Kukuřičná moučka.

Slouží jako matrice pro naředění vzorků minerálních krmiv a premixů. Moučka musí být namleta na částice menší než 1 mm. Může se použít i běžná kukuřičná mouka. Obsah nativní fytázy je v kukuřici zanedbatelný.

**4 Přístroje a pomůcky**

1 Vodní lázeň, termostatem kontrolovaná, se stojánkem pro 2ml zkumavky.

2 pH-metr, s odečítáním na dvě desetinná místa.

3 Magnetické míchačky.

4 Magnetická míchadla, (40 × 20) mm.

5 Analytické váhy, přesnost 0,1 mg.

6 Předvážky, přesnost 0,01 g.

7 Vortex mixer.

8 Centrifuga pro 2ml mikrocentrifugační zkumavky, (11000 – 20000) g.

9 Pipety (10 – 2000) µl.


10 Mikrotitrační destičky a spektrofotometr pro mikrotitrační destičky.

11 Mikrocentrifugační zkumavky, 2 ml.

12 Exsikátor.

13 Třepačka reciproční (přímočarý pohyb). .

14 Spektrofotometr.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10100.1 - Stanovení aktivity fytázy	Revize	0

## 5 Postup

Použijí se výhradně vzorky, které nejsou poškozené ani pozměněné transportem nebo skladováním.

### 5.1 Příprava vzorku (extrakce)

#### Krmná směs

Čtyři 5g navážky každého vzorku se přenesou do 50ml kuželových baněk. Do každé baňky se přidá 50 ml vody a 0,05 ml 10 % Tweenu 20 (15). Intenzivně se 45 min třepe nebo míchá. Z každé baňky se pipetou odeberou 2 ml takto získaného extraktu. Vloží se do mikrocentrifugačních zkumavek (11) a centrifuguje se 3 min při 11000 až 20 000 g.

#### Minerální krmivo, premix


Čtyři (0,5 g  $\pm$  0,001) g navážky vzorku namletého na částice menší než 0,5 mm se naváží do 800ml kádinek. Do každé se přidá (50  $\pm$  0,5) g kukuřičné moučky (23) a 500 ml acetátového pufru (17). Pak se 60 min intenzivně míchá na magnetické míchačce. Z každé kádinky se pipetou odeberou 2 ml extraktu, které se vloží do mikrocentrifugačních zkumavek (11) a centrifugují se 3 min po dobu při 11 000 až 20 000 g. Použití supernatantu je uvedeno v tabulce 1.

**Tabulka 1. Reakční objemy pro minerální krmiva a premixy.**

Očekávaná aktivita vzorku [U/kg] $\times$ 1000	Objem extraktu pro reakci [ $\mu$ l]	Objem pufru v reakci [ $\mu$ l]	Aktivita v reakci [U]	Faktor ředění D pro výpočet
10 až 25	300	100	0,003 - 0,0075	1,33
25 až 50	200	200	0,005 - 0,01	2
50 až 200	100	300	0,005 - 0,02	4
> 200	100	300	0,005 - 0,02	celkové vhodné ředění

#### Poznámky

- Poměr ředění vzorku minerálního krmiva a premixu: V praxi se minerální krmivo přidává do krmné směsi v množství (1 – 4) %, u premixů (0,2 – 1) %. Navážka 0,5 g vzorku a 50 g kukuřičné moučky odpovídá 1% mísicímu poměru. Tento mísicí poměr se používá jako konvence pro porovnatelnost výsledků z různých laboratoří, i když je deklarovaný mísicí poměr minerálních krmiv a premixů nižší nebo vyšší.*
- Pro zvýšení rozdílu v absorbanci v rozsahu (10 000 – 25 000) U/kg se může objem extraktu zvýšit na 400  $\mu$ l bez přidání acetátového pufru (17).*

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10100.1 - Stanovení aktivity fytázy	Revize	0

- 3 Vzorky s aktivitou fytázy nad 400 000 U/kg se naředí acetátovým pufrům (17) v poměru 1 : 1 předtím, než se smíchá 100 µl extraktu a 300 µl pufru (17) pro enzymatickou reakci. Pak je celkový faktor ředění 8.
- 4 Pokud je naměřená absorbance mimo kalibrační rozsah, stanovení se musí opakovat s vhodnějším naředěním.

## 5.2 Příprava standardů

### 5.2.1 Standardní fosfátová křivka

Standardní zásobní roztok fosfátu (20) se naředí postupným ředěním acetátovým pufrům s Tweenem 20 (17) podle tabulky 2.

**Tabulka 2. Stupně ředění fosfátové standardní křivky.**

Bod	Pufr (20) (ml)	Doplní se pufrům (17) na celkový objem (ml)	Koncentrace (µmol/ml)
A	3,5	10	7
B	5	20	5
C	3	20	3
D	2	20	2
E	1	20	1
F	0,6	50	0,24

### Poznámky

- 5 Konečná koncentrace v mikrocentrifugační zkumavce po 10-násobném naředěním pufrům (17), viz. tabulka č. 2. Přesná koncentrace se musí vypočítat (20).


### 5.2.2 Kontrolní fytáza

Do každé inkubace se zařadí fytázová kontrola. Zásobní roztok fytázy (21) známé aktivity se naředí na konečnou aktivitu mezi (0,15 – 0,25) U/ml. Přesná aktivita se přepočítá, zahrne se ředění z tabulky 4.

## 5.3 Standardní křivka

Anorganický fosfát ve vzorku se podílí na barevném komplexu, proto se pro každý vzorek naředí i blanky. Pro výpočet fytázové aktivity vzorků se odečtou hodnoty blanků od hodnot vzorků.

Tři paralelky a dva blanky se připraví pro každé ředění. Postup viz tabulka 3.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10100.1 - Stanovení aktivity fytázy	Revize	0

**Tabulka 3. Postup pro přípravu standardní křivky.**

Postup testu	Standardní vzorky	Blank
Acetátový pufr (17)	360 $\mu$ l	400 $\mu$ l
Standard (A – F) viz tab. 2	40 $\mu$ l	0
Fytátový substrát (19)	0,8 ml	0,8 ml
STOP činidlo (14)	0,8 ml	0,8 ml
Promíchat	ano	ano
Ponechat při laboratorní teplotě	10 min	10 min
Centrifugace	3 min při 11000 g	3 min při 11000 g
Měření na spektrofotometru	415 nm	415 nm


Popis testu: Do 2ml mikrocentrifugačních zkumavek se napipetuje 360  $\mu$ l acetátového pufru (17). Přidá se 40  $\mu$ l naředěného standardu (podle tab. 2, A – F). Pro přípravu blanků se pipetuje 400  $\mu$ l acetátového pufru (17) do 2ml mikrocentrifugačních zkumavek. Přidá se 0,8 ml substrátu (19) a 0,8 ml STOP činidla (14). Zkumavky se řádně promíchají a nechají se stát při laboratorní teplotě 10 min. Centrifuguje se 3 min při 11000 g. Do mikrotitračních destiček se pipetuje 200  $\mu$ l čistého supernatantu a měří se na spektrofotometru pro mikrotitrační destičky při vlnové délce 415 nm.

#### 5.4 Kontrola

Pro každé ředění se připraví 2 stanovení a 1 blank. Postup viz. tabulka 4.

**Tabulka 4. Postup pro úroveň kontroly – fytázy.**

Postup testu	Standardní vzorky fytázy	Blank
Acetátový pufr (17)	360 $\mu$ l	360 $\mu$ l
Vzorek standardní fytázy (podle bodu 5.2.2)	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l
Promíchat	ano	ano
Preinkubace při 37 °C	5 min	5 min
Fytátový substrát (19)	0,8 ml – STEP 1	0,8 ml – STEP 2
Mix	ne	ne
Inkubace při 37 °C	30 min	ne
STOP činidlo (14)	0,8 ml – STEP 2	0,8 ml – STEP 1
Promíchat	ano	ano
Ponechat při laboratorní teplotě	10 min	10 min
Centrifugace	3 min při 11000 g	3 min při 11000 g
Měření na spektrofotometru	415 nm	415 nm

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10100.1 - Stanovení aktivity fytázy	Revize	0

Popis testu: Do 2ml mikrocentrifugačních zkumavek se pipetuje 360 µl acetátového pufru (17). Přidá se 40 µl naředěného roztoku fytázy (podle bodu 5.2.2) a promíchá se. Vzorky se preinkubují 5 min při 37 °C ve vodní lázni. Přidá se 0,8 ml substrátu (19) předeřátého na 37 °C. Inkubační čas je přesně 30 min. při 37 °C. Po 30 min se přidá 0,8 ml STOP činidla (14) a promíchá se. Nechá se stát 10 min. při laboratorní teplotě, pak se centrifuguje 3 min. při 11000 g. Do mikrotitračních destiček se pipetuje 200 µl čistého supernatantu a měří se na spektrofotometru pro mikrotitrační destičky při vlnové délce 415 nm.

Blanky se preinkubují 5 min. při 37 °C ve vodní lázni , přidá se nejprve 0,8 ml STOP činidla (14) – STEP 1 (krok 1), potom 0,8 ml fytátového substrátového roztoku (19) – STEP 2 (krok 2).

## 5.5 Vzorky krmiva

Pro každou analýzu se připraví 2 paralelní zkumavky a jeden blank. Postup je popsán v tabulce 5.


**Tabulka 5. Postup pro vzorky krmiv.**

Postup testu	Vzorky krmiv	Blank
Acetátový pufr (17)	300 µl	300 µl
Vzorek krmiva (připravený podle bodu 5.1)	100 µl	100 µl
Promíchat	ano	ano
Preinkubace při 37 °C	5 min	5 min
Fytátový substrát (19)	0,8 ml – STEP 1	0,8 ml – STEP 2
Promíchat	ne	ne
Inkubace při 37 °C	30 min	ne
STOP činidlo (14)	0,8 ml – STEP 2	0,8 ml – STEP 1
Promíchat	ano	ano
Ponechat při laboratorní teplotě	10 min	10 min
Centrifugace	3 min při 11000 g	3 min při 11000 g
Měřit na spektrofotometru	415 nm	415 nm

### Poznámka

6 *Je vhodné vzorky krmiv naředit vodou na koncentraci fytázy (2,9 – 3,2) µmol/ml podle výrobcem deklarované hodnoty.*

Popis testu: Do 2ml mikrocentrifugačních zkumavek se pipetuje 300 µl acetátového pufru (17). Přidá se 100 µl naředěného vzorku krmiva, připraveného podle bodu 5.1 a promíchá se. Vzorky se preinkubují 5 min při 37 °C ve vodní lázni . Přidá se 0,8 ml substrátu (19) předeřátého na

	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10100.1 - Stanovení aktivity fytázy	Revize	0

37 °C. Inkubační čas je přesně 30 min. při 37 °C. Po 30 min se přidá 0,8 ml STOP činidla (14) a mikrocentrifugační zkumavky se promíchají. Nechá se stát 10 min. při laboratorní teplotě, pak se centrifugují 3 min při 11000 g. Do mikrotitračních destiček se pipetuje 200 µl čistého supernatantu a měří se na spektrofotometru pro mikrotitrační destičky při vlnové délce 415 nm.

Blanky se preinkubují 5 min. při 37 °C, přidá se nejprve 0,8 ml STOP činidla (14) - STEP1 (krok 1), potom 0,8 ml fytátového substrátového roztoku (19) – STEP 2 (krok 2).

## 6 Výpočty

### 6.1 Sestrojení standardní křivky

Standardní křivka se sestojí z rozdílů absorbancí  $\Delta A_{415}$  ( $A_{415\text{standard}} - A_{415\text{blank}}$ ) získaných s fosfátovými standardy (5.2.1 a 5.3) na ose  $y$  a vypočítanými koncentracemi fosfátu na ose  $x$ . Do výpočtu koncentrací se musí zahrnout i ředění 1 : 10 v mikrocentrifugačních zkumavkách, tj. 40 µl ředěného standardu (tabulka 1) + 360 µl pufru. Odpovídající křivka se vypočítá pomocí lineární regrese  $y = m \times x$ .

### 6.2 Výpočet fytázové aktivity

Aktivita fytázy ( $a_{\text{fytáza}}$ ) se vypočítá takto

$$a_{\text{fytáza}} = \frac{\Delta A \times D}{m \times W \times t}$$

kde

- $\Delta A$  je rozdíl absorbancí  $A_{415\text{vzorku}} - A_{415\text{blanku}}$ ,
- $m$  směrnice standardní křivky  $A_{415}$ , ( $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ),
- $D$  ředící faktor (extrakční objem  $\times$  ředění extraktu) (ml),
- $W$  hmotnost vzorku, (g resp. kg),
- $t$  inkubační čas (min).

### Poznámky

- 7 Čistota a obsah vody ve fytátové kyselině se liší v jednotlivých šaržích, a proto by se měl zahrnout do výpočtu přípravy substrátu.

*Příklad:*


*Fytát dodekasodný (phytic acid dodecasodium salt; 0,008 % inorganic phosphorous) např. P0109, Sigma, Lot 057K0049 obsahuje:*

*Fytát (phytic acid) molekulová hmotnost, 923,8 g/mol*

*Čistota (purity) 97 %*

*Obsah vody (water) 12,6 %*



	Národní referenční laboratoř	Strana	9
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10100.1 - Stanovení aktivity fytázy	Revize	0

$$FK = \frac{0,0075 \text{ mol} \times 923,8 \text{ g}}{1 \times \text{mol} \times 0,97 \times 0,874} = 8,17 \text{ g/l}$$

*FK – navážka v g na přípravu 1 litru roztoku fytátu o koncentraci 7,5 mmol/l.*

*Vysoký obsah např. MCP (fosforečnan vápenatý) ve vzorcích krmiva vede k vyšším hodnotám blanků ( $A_{415} > 1,6$ ). Některé spektrofotometry nemusejí měřit lineárně při vyšších hodnotách absorbance (blížící se k 2). Hodnoty fytázy, získané ze vzorků krmiva s tak vysokými hodnotami blanku musejí být pečlivě hodnoceny, protože vysoké hodnoty absorbance mohou vést k nadhodnocení nebo podhodnocení obsahu fytázy. Naředění extraktu krmiva 1 : 2 nebo 1 : 4 může pomoci redukovat hodnotu absorbance. Ale hodnota  $A_{415}$  by měla být  $> 0,04$ .*

## 7 Literatura

- 1 EN ISO 30024 : 2009 – Krmiva – Stanovení aktivity fytázy.
- 2 VDLUFA Asocciation Method Book III, 27.1.3 – Příprava minerálních krmiv a premixů pro stanovení aktivity fytázy.