

DIN EN ISO 30024



ICS 65.120

Einsprüche bis 2023-04-24
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 30024:2009-11

Entwurf

**Futtermittel –
Bestimmung der Phytaseaktivität (ISO/DIS 30024:2023);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 30024:2023**

Animal feeding stuffs –
Determination of phytase activity (ISO/DIS 30024:2023);
German and English version prEN ISO 30024:2023

Aliments des animaux –
Détermination de l'activité phytasique (ISO/DIS 30024:2023);
Version allemande et anglaise prEN ISO 30024:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-02-24 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 62 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 30024:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Lebensmittelerzeugnisse“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 6497	siehe	DIN EN ISO 6497
ISO 6498	siehe	DIN EN ISO 6498

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 30024:2009-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Erweiterung des Anwendungsbereichs auf Vormischungen, Mineralfuttermittel und Futtermittelzusatzstoffe;
- b) Anpassung der Spezifikationen für Phytinsäure (Phytatsubstrat);
- c) Norm redaktionell überarbeitet und an die derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst (neuer Abschnitt 2 Normative Verweisungen, neue Anhänge usw.).

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6497, *Futtermittel — Probenahme*

DIN EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung*

– *Entwurf* –

E DIN EN ISO 30024:2023-04

– Leerseite –

Futtermittel – Bestimmung der Phytaseaktivität (ISO/DIS 30024:2023)

Animal feeding stuffs – Determination of phytase activity (ISO/DIS 30024:2023)

Aliments des animaux – Détermination de l'activité phytasique (ISO/DIS 30024:2023)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	9
5 Reagenzien	9
6 Geräte	12
7 Probenahme und Probenvorbereitung	12
8 Probenextraktionen	13
8.1 Für Mischfuttermittel (außer Mineralfuttermittel)	13
8.2 Für Mineralfuttermittel und Vormischungen	13
8.3 Für Futtermittelzusatzstoffe	13
9 Durchführung	14
9.1 Blindlösung	14
9.2 Standards	14
9.2.1 Phosphat-Standardlösung	14
9.2.2 Kontrolle des Phytasegehalts	14
9.3 Standardkurve	14
9.4 Kontrolle des Phytasegehalts	15
9.5 Für Mischfuttermittel (außer Mineralfuttermittel)	16
9.6 Für Mineralfuttermittel und Vormischungen	17
9.7 Für Futtermittelzusatzstoffe	18
10 Berechnungen	19
10.1 Erstellen der Kalibrierkurve	19
10.2 Berechnung der Phytaseaktivität	19
10.3 Korrektur für die Reinheit der Phytinsäure und den Wassergehalt	20
10.4 Interferenz mit Blindwerten	21
11 Präzision	21
11.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenze	21
11.2 Ringversuche	21
11.3 Wiederholpräzision	21
11.4 Vergleichpräzision	22
12 Prüfbericht	22
Anhang A (informativ) Ergebnisse der Ringversuche zu Mischfuttermitteln (außer Mineralfuttermittel)	23
A.1 Erster Ringversuch	23
A.2 Zweiter Ringversuch	25
A.3 Dritter Ringversuch zu Ergänzungsmischfuttermitteln	26
Anhang B (informativ) Ergebnisse der Ringversuche zu Mineralfuttermitteln und Vormischungen	28
Anhang C (informativ) Ergebnisse der Ringversuche zu Futtermittelzusatzstoffen	29
Literaturhinweise	31

Bilder

Bild 1 — Beispiel eines Ausdruckes der optischen Dichte versus Konzentration für Phosphat-Standard-farbmetrische Lösungen, gepuffert mit 0,25 mol/l Acetat, Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16) enthaltend	19
--	----

Bild A.1 — Darstellung der Variationskoeffizienten der Wiederholpräzision und der Vergleichpräzision gegenüber der Probenidentifizierung im EURL-FA-NRL Ringversuch .	26
--	-----------

Tabellen

Tabelle 1 — Verdünnungsschritte, um Standard-farbmétrische Lösungen für die Phosphatgerade zu erhalten	14
Tabelle 2 — Verfahren zur Kalibrierkurve	15
Tabelle 3 — Verfahren zur Überprüfung des Gehalts	16
Tabelle 4 — Verfahren für Mischfuttermittel (außer mineralischem Futtermittel)	17
Tabelle 5 — Volumen für Mineralfuttermittel und Vormischungen	17
Tabelle 6 — Volumen für Futtermittelzusatzstoffe	18
Tabelle A.1 — Präzisionsdaten des Verfahrens aus dem ersten/ursprünglichen Ringversuch . . .	24
Tabelle A.2 — Ergebnisse der Bestimmung der Phytaseaktivität in 3 Alleinfuttermitteln, die 4a16-Phytase als Futtermittelzusatzstoff enthalten	25
Tabelle A.3 — Ergebnisse der Bestimmung der Phytaseaktivität in 5 Ergänzungsmischfuttermitteln, die 4a1640-Phytase als Futtermittelzusatzstoff enthalten	26
Tabelle A.4 — Beschreibung der Proben und deklarierte Größe der Phytaseaktivität in jeder Probe	27
Tabelle B.1 — Ergebnisse der Bestimmung der Phytaseaktivität in Vormischungen und Mineralfuttermitteln mit drei Phytaseprodukten	28
Tabelle C.1 — Ergebnisse der Bestimmung der Phytaseaktivität in sieben verschiedenen Phytaseprodukten	29
Tabelle C.2 — Ergebnisse der Bestimmung der Phytaseaktivität in 2 (4a16)-Phytase-Futtermittelzusatzstoffen	30

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 30024:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 30024:2009 ersetzen.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 30024:2023 wurde von CEN als prEN ISO 30024:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktives, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktives, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 10, *Animal feeding stuffs* erarbeitet.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 30024:2009), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Erweiterung des Anwendungsbereichs um Vormischungen, Mineralfuttermittel und Futtermittelzusatzstoffe;
- Anpassung der Spezifikationen zu Phytinsäure (Phytatsubstrat);
- redaktionelle Änderungen (neuer Abschnitt zu normativen Verweisungen, neue Anhänge.....).

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Diese Internationale Norm wurde erstellt, um die Menge von Phytase-Produkten in Futtermittelproben zu bestimmen und damit die Europäische Kommission in die Lage zu versetzen, den Phytasegehalt in Futtermitteln zu überwachen. Das Verfahren kann jedoch nicht zur Bewertung der in vivo-Wirksamkeit der Phytase-Produkte angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt die Bestimmung der Phytaseaktivität in Futtermittelproben, einschließlich Futtermittel-Ausgangsstoffen pflanzlichen Ursprungs, Mischfuttermitteln (Allein-, Ergänzungs- und Mineralfuttermittel), Vormischungen und Futtermittelzusatzstoffen, fest.

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch für die Bestimmung der Phytaseaktivität in Alleinfuttermittel, Ergänzungsfuttermittel einschließlich Mineralfuttermittel, Vormischungen und Futtermittelzusatzstoffen validiert.

Das Verfahren unterscheidet nicht zwischen Phytase, die als Futtermittelzusatzstoff zugefügt wurde und endogener Phytase, die bereits in den Futtermittel-Ausgangsstoffen vorhanden war. Daher ist das Verfahren auch für Futtermittel-Ausgangsstoffe pflanzlichen Ursprungs anwendbar.

Das Verfahren kann nicht zur Bewertung oder zum Vergleich der in vivo-Wirksamkeit von Phytase-Produkten angewendet werden. Es dient auch nicht als Verfahren zur Vorhersage der in vivo-Wirksamkeit von auf dem Markt angebotenen Phytasen, da sich diese in vivo-Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Einheit für die Aktivität unterschiedlich entwickeln kann.

ANMERKUNG 1 Produkte, die nicht in die Validierungsstudien in Anhang A, Anhang B oder Anhang C einbezogen waren, müssen insbesondere hinsichtlich der Linearität ihres Ansprechverhaltens (Freisetzung von Phosphor) untersucht werden.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Phytaseeinheit (U, FTU, FYT)

Menge von Enzym, die unter den in dieser Internationalen Norm festgelegten Reaktionsbedingungen in Acetatpuffer bei einem pH-Wert von 5,5 und 37 °C aus Phytat in einer Minute 1 µmol anorganisches Phosphat freisetzt

3.2

Vormischung

Mischungen von Futtermittelzusatzstoffen oder Mischungen aus einem oder mehreren Futtermittelzusatzstoffen mit Futtermittel-Ausgangserzeugnissen oder Wasser als Trägern, die nicht für die direkte Verfütterung an Tiere bestimmt sind

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, Artikel 2, Absatz 2 e)]

3.3

Vormischung

gleichmäßige Mischung von einem oder mehreren Mikrobestandteilen/Futtermittelzusatzstoffen mit einem Verdünnungsmittel und/oder einem Trägerstoff, die nicht für die direkte Verfütterung an Tiere bestimmt ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Vormischungen werden verwendet, um die gleichmäßige Feinverteilung der Mikrobestandteile/Zusatzstoffe in einer größeren Mischung zu ermöglichen.

[QUELLE: ISO 20588, *Animal feeding stuffs — Vocabulary*; Unterabschnitt 3.2.39]

3.4

Mineralfuttermittel

Ergänzungsfuttermittel mit mindestens 40 % Rohasche

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 767/2009, Artikel 3, Absatz 1 k)]

3.5

Mineralstoffmischung

Mineralstoffzusatz

Mineralfuttermittel

Futtermittel, das hauptsächlich aus mineralischen Bestandteilen besteht und das als gesamte Mischung rieselfähig ist

[QUELLE: ISO 20588, *Animal feeding stuffs — Vocabulary*; Unterabschnitt 3.2.37]

3.6

Futtermittelzusatzstoff

Stoffe, Mikroorganismen oder Zubereitungen, die keine Futtermittel-Ausgangserzeugnisse oder Vormischungen sind und bewusst Futtermitteln oder Wasser zugesetzt werden, um insbesondere eine oder mehrere Funktionen zu erfüllen

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, Artikel 2, Absatz 2 a)]

3.7

Futtermittelzusatzstoff

Stoff, der absichtlich zu Futtermittel und/oder Wasser hinzugegeben wird, nicht selbst als Futter verzehrt wird, unabhängig davon, ob er einen Nährwert hat oder nicht, und der sich auf die Eigenschaften eines Futtermittels einschließlich organoleptischer Eigenschaften, auf Tiererzeugnisse, Tierhaltung oder -leistung oder Tierwohl oder die Umwelt auswirkt

Anmerkung 1 zum Begriff: Abhängig von Verwendungszweck und Art der Verabreichung fallen unter den Anwendungsbereich dieser Definition Mikroorganismen, Enzyme, Säureregulatoren, Spurenelemente, Vitamine und weitere Produkte.

Anmerkung 2 zum Begriff: Kokzidiostatika und Histomonostatika sind eine Kategorie von Futtermittelzusatzstoffen.

Anmerkung 3 zum Begriff: Futtermittelzusatzstoff umfasst nicht Futtermittel-Ausgangsstoffe und Vormischungen.

[QUELLE: ISO 20588, *Animal feeding stuffs — Vocabulary*; Unterabschnitt 3.2.18]

3.8

Mischfuttermittel

Mischung aus mindestens zwei Einzelfuttermitteln, mit Futtermittelzusatzstoffen oder ohne Futtermittelzusatzstoffe, die zur oralen Fütterung in Form eines Alleinfuttermittels oder Ergänzungsfuttermittels bestimmt sind

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 767/2009, Artikel 3, Absatz 1 h)]

3.9

Mischfuttermittel

Futtermittelmischung

Mischung aus mindestens zwei Einzelfuttermitteln, mit Futtermittelzusatzstoffen oder ohne Futtermittelzusatzstoffe, die zur oralen Fütterung in Form eines Ergänzungsfuttermittels oder Alleinfuttermittels bestimmt sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Alleinfuttermittel ist eine Art von Mischfuttermittel.

Anmerkung 2 zum Begriff: Ergänzungsfuttermittel ist eine Art von Mischfuttermittel.

[QUELLE: ISO 20588, *Animal feeding stuffs — Vocabulary*; Unterabschnitte 3.2.9; 3.2.10; 3.2.11]

3.10

Einzelfuttermittel

Erzeugnisse pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, die vorrangig zur Deckung des Ernährungsbedarfs von Tieren dienen, im natürlichen Zustand, frisch oder haltbar gemacht, und Erzeugnisse ihrer industriellen Verarbeitung sowie organische oder anorganische Stoffe, mit Futtermittelzusatzstoffen oder ohne Futtermittelzusatzstoffe, die zur Tierernährung durch orale Fütterung bestimmt sind, sei es unmittelbar als solche oder in verarbeiteter Form, für die Herstellung von Mischfuttermitteln oder als Trägerstoff für Vormischungen

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 767/2009, Artikel 3, Absatz 1 g)]

3.11

Einzelfuttermittel

Erzeugnisse pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, mit *Futtermittelzusatzstoffen* oder ohne Futtermittelzusatzstoffe, die zur Tierernährung durch orale Fütterung und Deckung des Ernährungsbedarfs von Tieren bestimmt sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Einzelfuttermittel können sich im natürlichen Zustand befinden, frisch oder haltbar gemacht, oder Erzeugnisse der industriellen Verarbeitung sowie entweder organische oder anorganische Stoffe sein.

Anmerkung 2 zum Begriff: Einzelfuttermittel dürfen unmittelbar als solche oder in verarbeiteter Form an Tiere gefüttert werden oder für die Herstellung von Mischfuttermitteln oder als Trägerstoff für Vormischungen verwendet werden.

[QUELLE: ISO 20588, *Animal feeding stuffs — Vocabulary*; Unterabschnitt 3.2.23]

4 Kurzbeschreibung

Phytase setzt aus dem Substrat myo-Inositol-Hexakisphosphat (Phytat) Phosphat frei. Das freigesetzte anorganische Phosphat wird durch Bildung eines gelben Komplexes mit einem sauren Molybdat-Vanadat-Reagens bestimmt. Die optische Dichte (OD) des gelben Komplexes wird bei einer Wellenlänge von 415 nm gemessen, und die mengenmäßige Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphats erfolgt mit Hilfe einer Phosphat-Standard-Kalibrierkurve.

5 Reagenzien

Während der Analyse sind, sofern nicht anders festgelegt, nur Reagenzien in anerkannter analytischer Reinheit sowie destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser entsprechender Reinheit anzuwenden.

WARNUNG — Die Anwendung dieses Verfahrens erfordert den Umgang mit gefährlichen Substanzen. Regionale Vorschriften für potentiell gefährliche Chemikalien sind einzuhalten, um Risiken hinsichtlich organisatorischer, technischer und persönlicher Sicherheit zu minimieren.

5.1 Ammoniaklösung, 25 % Massenanteil; NH_3 .

5.2 Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

5.3 Ammoniummonovanadat, NH_4VO_3 .

5.4 Salzsäure, 25 % Massenanteil; HCl .

5.5 Salpetersäure, 65 % Massenanteil; HNO_3 .

5.6 Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 .

5.7 Phytat (anionische Form der Phytinsäure), **Phytinsäure**

5.7.1 Spezifikationen zu Phytat

- Alle Formen von Phytaten oder Phytinsäure sind zur Verwendung zugelassen [zum Beispiel Phytinsäure (PA), Phytinsäure-Dodecanatriumsalz (Na-PA), Phytinsäure-Dodecalkaliumsalz (K-PA), Phytinsäure-Hexamagnesiumsalz-n-Hydrat (Mg-PA)].
- $\leq 0,1$ % Massenanteil anorganischer Phosphor.
- Prüfen, ob ≥ 90 % Phosphor-(P-)Basis (Trockenmasse).
- Das Substrat sollte einen Anteil von mehr als 95 % IP6 (= Hexaphosphat-Inositol, das 6 Phosphatgruppen enthält) aufweisen.

ANMERKUNG 1 Angaben zum IP6-Verhältnis bzw. -Anteil sind auf Nachfrage vom Lieferanten erhältlich. Da Phytinsäure-Salzhydrate mit unterschiedlichen Gehalten an Kristallwasser geliefert werden, ist sicherzustellen, dass der Kristallwassergehalt im stöchiometrischen Bereich von 10 mol bis 13 mol liegt. Im Fall einer Abweichung siehe 10.3.

5.7.2 Kontrolle des Phytats

Die optische Dichte (OD) der Blindproben aus der Standardkurve, siehe 9.3 muss weniger als 0,2 betragen; ein höherer OD-Wert weist auf eine Phosphat- oder Phytase-Kontamination der verwendeten Reagenzien hin.

5.8 Natriumacetat-Trihydrat, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$.

5.9 Polysorbat 20¹.

5.10 Verdünnte Salpetersäure.

1 Volumenteil Salpetersäure, 65 % Massenanteil (5.5), wird mit 2 Volumenteilen Wasser verdünnt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit ist unbegrenzt.

5.11 Ammoniumheptamolybdat-Reagens.

100,0 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat (5.2) werden in etwa 800 ml Wasser gelöst (zur Erleichterung der Lösung des Salzes darf heißes Wasser von 50 °C bis 60 °C verwendet werden). 10 ml der Ammoniaklösung, 25 % Massenanteil (5.1), werden hinzugefügt, dann wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit beträgt 2 Monate.

5.12 Ammonium-Vanadat-Reagens.

2,35 g Ammoniummonovanadat (5.3) werden vollständig in etwa 400 ml Wasser gelöst (zur Erleichterung der Lösung des Salzes darf heißes Wasser von 50 °C bis 60 °C verwendet werden). 20 ml der verdünnten Salpeter-

1 Tween 20 ist ein Beispiel eines geeigneten handelsüblichen Produktes. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO.

säure (5.10) werden hinzugefügt und mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit beträgt 2 Monate.

5.13 Molybdat-Vanadat-Stopp-Reagens.

1 Volumenteil Ammonium-Vanadat-Reagens (5.12) wird mit 1 Volumenteil Ammoniumheptamolybdat-Reagens (5.11) und 2 Volumenteilen verdünnter Salpetersäure (5.10) gemischt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gemischt und aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit beträgt 1 Tag.

5.14 Polysorbat 20, 10 % Massenanteil.

10,0 g Polysorbat 20 (5.9) werden mit Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit beträgt 6 Monate.

5.15 Acetatpuffer, pH-Wert 5,5; 0,25 mol/l.

34,0 g Natriumacetat-Trihydrat (5.8) werden in etwa 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Salzsäure, 25 % Massenanteil (5.4), auf $5,50 \pm 0,02$ eingestellt, und dann wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit beträgt 2 Wochen.

5.16 Acetatpuffer mit 0,01 % Massenanteil Polysorbat 20, pH-Wert 5,5; 0,25 mol/l.

34,0 g Natriumacetat-Trihydrat (5.8) werden in etwa 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Salzsäure, 25 % Massenanteil (5.4), auf $5,50 \pm 0,02$ eingestellt. 1 ml des Polysorbat 20, 10 % Massenanteil (5.14) wird hinzugefügt, und dann wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit beträgt 2 Wochen.

5.17 Acetatpuffer mit 0,01 % Massenanteil Polysorbat 20, pH 5,5; 0,50 mol/l.

68,0 g Natriumacetat-Trihydrat (5.8) werden in etwa 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Salzsäure, 25 % Massenanteil (5.4), auf $5,50 \pm 0,02$ eingestellt. 1 ml des Polysorbat 20, 10 % Massenanteil (5.14) wird hinzugefügt, und dann wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit beträgt 2 Wochen.

5.18 Phytatsubstrat-Lösung, 7,5 mmol/l (Endkonzentration bei Reaktion: 3 mmol/l).

2,00 g Phytat (5.7) werden in etwa 200 ml Acetatpuffer (5.15) gelöst. Der pH-Wert wird auf $5,50 \pm 0,02$ eingestellt, zum Beispiel mit Salzsäure, 25 % Massenanteil (5.4), und dann wird die Lösung mit Acetatpuffer (5.15) auf 250 ml aufgefüllt. Die maximale Lagerzeit beträgt 2 Wochen bei einer Temperatur von 4 °C.

5.19 Phosphat-Standard-Stammlösung, 50 mmol/l.

Etwa 10 g Kaliumdihydrogenphosphat (5.6) werden bei 105 °C für 2 h getrocknet und in einem Exsikkator aufbewahrt. Etwa 682 mg des getrockneten Kaliumdihydrogenphosphats werden gewogen, quantitativ in einem 100-ml-Messkolben überführt und mit 0,25 mol/l Acetatpuffer mit Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16) auf 100 ml aufgefüllt. Die exakte Konzentration der Phosphat-Standard-Stammlösung wird berechnet. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit beträgt 2 Wochen.

5.20 Zertifizierter Phytase-Standard, als Qualitätskontrollprobe; Phytaseaktivität von nicht weniger als 3 500 UI/g.

5.21 Phytase-Standard-Stammlösung.

100,0 mg bis 300,0 mg eines zertifizierten Phytase-Standards (5.20) werden gewogen, quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführt und in ungefähr 80 ml 0,25 mol/l Acetatpuffer mit Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16) gelöst. Die Lösung wird 15 min bis 45 min gerührt. Nach Entfernen des Magnetrührers wird mit 0,25 mol/l Acetatpuffer mit Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16) bis zur Markierung aufgefüllt.

5.22 Gemahlener Mais

Unverarbeiteter Körnermais/Bruchmais wird auf eine Partikelgröße von weniger als 1 mm oder 2 mm gemahlen und als Verdünnungsmatrix für die Analyse von Mineralfuttermitteln und Vormischungen verwendet (siehe 8.2). Konventionelles Maismehl kann ebenfalls verwendet werden. Die Phytaseaktivität in gemahlenem Mais/Maismehl ist an sich vernachlässigbar, aber um sie vollständig auszuschließen und um einen signifikanten Einfluss durch das Multiplizieren der Verdünnungen bei der Ergebnisberechnung zu verhindern, wird empfohlen, das Mehl über Nacht auf 130 °C zu erhitzen.

ANMERKUNG 1 Eine dem Mais gegenüber gleichwertige Matrix, wie etwa Sojaproteinkonzentrat, ohne Phytaseaktivität, ist möglich; diese sollte jedoch intern validiert werden.

6 Geräte

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes

6.1 Wasserbad, thermostatisch geregelt auf $(37 \pm 0,2)$ °C (mit Einsätzen für 2-ml-Zentrifugengläser).

6.2 pH-Messgerät, ablesbar auf mindestens zwei Dezimalstellen.

6.3 Magnetrührer (≥ 20 W Leistung).

6.4 Eiförmige Magnetrührstäbchen (40 mm $\times$ 20 mm).

6.5 Analysenwaage, geeignet zum Ablesen auf mindestens 0,1 mg.

6.6 Waage, geeignet zum Ablesen auf mindestens 0,01 g.

6.7 Vortex-Mischer.

6.8 Zentrifuge für Mikrozentrifugengläser (6.12), geeignet für 11 000 *g* bis 20 000 *g*.

6.9 Elektronischer Dispenser.

6.10 Pipetten (elektronisch und manuell), im Bereich von 10 μ l bis 2 000 μ l.

6.11 Spektralphotometer, Zweistrahlsspektralphotometer oder Lesegerät mit Mikroplatten.

6.12 Mikrozentrifugengläser, Fassungsvermögen 2 ml.

7 Probenahme und Probenvorbereitung

An das Labor sollte eine repräsentative Probe verschickt werden. Sie sollte nicht durch Transport oder Lagerung beschädigt oder verändert sein.

Probenahme ist nicht Teil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren wird in ISO 6497 [1] beschrieben.

Probenvorbereitung ist nicht Teil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Verfahren zur Probenvorbereitung wird in ISO 6498 [2] mit den folgenden Erläuterungen beschrieben:

- Zerkleinern von Mischfuttermittel und Futtermittel-Ausgangsstoffen < 1 mm, wenn der CVr zu hoch ist;
- Zerkleinern von Proben aus mineralischem Mischfuttermittel und Vormischungen $< 0,5$ mm (siehe [6]);
- beschichtete Futtermittelzusatzstoffe oder Produkte mit einer größeren Partikelgröße könnten im Mörser zerstoßen werden (siehe [7]).

8 Probenextraktionen

8.1 Für Mischfuttermittel (außer Mineralfuttermittel)

Für jede Probe werden zwei Wägungen durchgeführt.

Zwei Prüfmengen von Pellets oder mehlartigem Futtermittel von je etwa 50 g werden in 500-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Dem Futtermittel werden 500 ml Wasser und 0,5 ml Polysorbat 20, 10 % Massenanteil (5.14), hinzugefügt, und dies wird mit einem Magnetrührer (6.3) mit eiförmigen Magnetrührstäbchen (6.4) 45 min kräftig gemischt.

ANMERKUNG Eine Inhomogenität der Probe kann, neben weiteren Ursachen, zu hohen Variationskoeffizienten (CVr; siehe 11.3) führen. Bei Mischfuttermittelproben mit einem hohen CVr kann die Inhomogenität auf eine ungleichmäßige Teilchengrößenverteilung in den Produkten oder eine inhomogene Vorbereitung des Mischfuttermittels zurückzuführen sein. Falls Mischfuttermittelproben hohe CVr aufweisen, werden die Mischfuttermittelproben wie in ISO 6498 beschrieben oder mittels einer Ultrazentrifugalmühle² mit einem Sieb der Öffnungs-nenngröße 1 mm zerkleinert. 150 g Mischfuttermittel werden zerkleinert. Mit den zerkleinerten Proben wird die in diesem Abschnitt beschriebene Extraktion wiederholt.

8.2 Für Mineralfuttermittel und Vormischungen

Dieser Absatz gilt bei Phytaseaktivitäten in Mineralfuttermitteln und Vormischungen von mehr als 10 000 U/kg, aber weniger als 2 000 000 U/kg.

(0,5 ± 0,001) g zerkleinerte Probe (empfohlener Zerkleinerungsgrad kleiner als 0,5 mm) und (50 ± 0,5) g gemahlener Mais (5.22) werden in doppelter Ausführung in 800-ml-Bechergläsern eingewogen. In jedes Becherglas werden 500 ml Acetatpuffer (5.16) hinzugefügt und es wird 60 min mit einem Magnetrührer (6.3) kräftig gemischt.

ANMERKUNG Mischverhältnis: In der Praxis wird Mineralfuttermittel in einem Anteil von 1 % bis 4 % zu Alleinfuttermittel hinzugegeben, Vormischungen hingegen in einem Anteil von 0,2 % bis 1 %. Die Einwaage von 0,5 g Probe und 50 g Mais entspricht einem Mischanteil von 1 %. Dieser Mischanteil wird als Vorgabe zwecks der Vergleichbarkeit der Ergebnisse der verschiedenen Labore angewandt – auch wenn der deklarierte Mischanteil von Mineralfuttermittel/Vormischung niedriger oder höher ist.

8.3 Für Futtermittelzusatzstoffe

Dieser Absatz gilt bei Phytaseaktivitäten in festen oder flüssigen Futtermittelzusatzstoffen von mehr als 2 000 U/g (2 000 000 U/kg).

Für Proben von flüssigen Futtermittelzusatzstoffen:

Die Proben (0,5 g oder 1 g nach Tabelle 6) werden in doppelter Ausführung auf 1 mg in 100-ml-Messkolben eingewogen. In jeden Messkolben werden ungefähr 80 ml Acetatpuffer (5.16) hinzugefügt und es wird 30 min mit einem Magnetrührer (6.3) gemischt. Nach Entfernen des Magnetrührers wird mit Acetatpuffer (5.16) auf 100,0 ml aufgefüllt.

Für Proben von festen Futtermittelzusatzstoffen:

Die Proben (0,5 g oder 1 g nach Tabelle 6) werden in doppelter Ausführung auf 1 mg in 250-ml-Bechergläser eingewogen. In jedes Becherglas werden genau 100,0 ml Acetatpuffer (5.16) hinzugefügt und es wird 30 min mit einem Magnetrührer (6.3) gemischt.

2 Beispiel eines geeigneten handelsüblichen Produktes. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO.

ANMERKUNG Falls Inhomogenitäten oder eine schlechte Wiederholpräzision auftreten, kann die Masse der Probe erhöht und das Extraktionsvolumen entsprechend angepasst werden.

9 Durchführung

ANMERKUNG 1 Die nachfolgend beschriebenen Reaktionsvolumen können vervielfacht werden, wenn ein Photometer mit einer 1-cm-Küvette oder einer Durchflusszelle verwendet wird. Bei Futtermittelproben muss ein entsprechend höheres Volumen Suspension (z. B. 10 ml) mittels einer konventionellen Laborzentrifuge 15 min bei ungefähr 3 000 *g* oder 3500 *g* zentrifugiert werden. Alternativ können größere Probenvolumen auch durch Faltenfilter gefiltert werden. Dann sollten die ersten 5 ml verworfen werden. Der Überstand oder das Filtrat oder die Phosphat-Standardlösung oder die Lösung zur Kontrolle des Phytasegehalts wird dann mit größeren Volumina Acetatpuffer, Phytatsubstrat-Lösung und Stopp-Reagens verwendet.

ANMERKUNG 2 Bei Probenextrakten und bei der Kontrolle des Phytasegehalts muss, wenn die gemessene Absorption nicht innerhalb des Kalibrierbereichs (Absorption/Phosphatkonzentration) liegt, die Bestimmung mit einer geeigneten Verdünnung wiederholt werden.

9.1 Blindlösung

Anorganisches Phosphat in der Probe trägt zur Farbbildung bei. Deshalb werden für jede Probe Blindproben einbezogen. Zur Berechnung der Phytaseaktivität sind die Blindwerte von den Prüfwerten zu subtrahieren.

9.2 Standards

9.2.1 Phosphat-Standardlösung

Die Phosphat-Standard-Stammlösung (5.19) wird nach Tabelle 1 mit 0,25 mol/l Acetatpuffer, der Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16) enthält, verdünnt.

Tabelle 1 — Verdünnungsschritte, um Standard-farbmétrische Lösungen für die Phosphatgerade zu erhalten

Standard-lösung	Volumen Phosphat-Standard-Stammlösung (5.19)	Volumen 0,25 mol/l Acetatpuffer mit Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16)	Verdünnungs-faktor	Konzentration μmol/ml ^a
A	1	1	2	25
B	1	3	4	12,5
C	1	7	8	6,25
D	1	15	16	3,125

^a Die exakten Konzentrationen werden berechnet (5.19).

9.2.2 Kontrolle des Phytasegehalts

Für jede Inkubation der Proben wird eine Kontrolle des Phytasegehalts durchgeführt. Eine Phytase-Standard-Stammlösung (5.21) mit bekannter Aktivität wird auf eine endgültige Aktivität von 0,15 U/ml bis 0,25 U/ml verdünnt, und die exakte Aktivität wird, wie in 9.4 beschrieben, bestimmt.

9.3 Standardkurve

Es werden drei Bestimmungen für jede Phosphatverdünnung und zwei Blindproben durchgeführt und der Durchschnitt der Ergebnisse wird berechnet. Das Verfahren ist in Tabelle 2 festgelegt.

Die bei den drei Bestimmungen beobachteten Abweichungen zwischen den höchsten und niedrigsten Werten, ausgedrückt als (höchster Wert – niedrigster Wert)/niedrigster Wert, beträgt nicht mehr als 15 %. Falls doch, dann werden drei neue Bestimmungen durchgeführt.

Um die Phytaseprodukte in einem linearen Bereich zu halten, empfiehlt es sich, dass die Kalibriergerade nicht mehr als 0,5 der OD abdeckt.

Für die Phosphat-Standardlösungen werden 360 µl 0,25 mol/l Acetatpuffer mit Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16), in ein 2-ml-Zentrifugenglas (6.12) pipettiert. Es werden 40 µl Phosphat-Standardlösung (Tabelle 1) hinzugefügt.

Für die Phosphat-Standard-Blindwertbestimmungen werden 400 µl 0,25 mol/l Acetatpuffer mit Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16), in ein 2-ml-Zentrifugenglas (6.12) pipettiert.

In beiden Fällen werden 0,8 ml der Phytatsubstrat-Lösung (5.18) und 0,8 ml des Stopp-Reagens (5.13) hinzugefügt. Der Inhalt der Zentrifugengläser wird gemischt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zentrifugengläser und deren Inhalt werden für 3 min bei 11 000 *g* bis 20 000 *g* zentrifugiert (6.8) und die OD der klaren, überstehenden Flüssigkeit wird bei 415 nm, *D*(415) gemessen.

Tabelle 2 — Verfahren zur Kalibrierkurve

Arbeitsschritte bei der Bestimmung	Standard-farbmetrische Lösungen	Blindwertproben
Acetatpuffer 0,25 mol/l mit Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16)	360 µl	400 µl
Phosphat-Standardlösung (5.2.1)	40 µl	0 µl
Phytatsubstrat-Lösung (5.18)	0,8 ml	0,8 ml
Stopp-Reagens (5.13)	0,8 ml	0,8 ml
Mischen	Ja	Ja
Raumtemperatur	10 min	10 min
Zentrifugieren	3 min bei 11 000 <i>g</i> bis 20 000 <i>g</i>	3 min bei 11 000 <i>g</i> bis 20 000 <i>g</i>
Spektralphotometer (5.11)	415 nm (gegen Wasser)	415 nm (gegen Wasser)

9.4 Kontrolle des Phytasegehalts

Es werden drei Bestimmungen für jede Verdünnung und zwei Blindproben durchgeführt und der Durchschnitt der Ergebnisse wird berechnet. Das Verfahren ist in Tabelle 3 festgelegt.

Für die Lösungen zur Bestimmung des Phytasegehalts werden 360 µl 0,25 mol/l Acetatpuffer mit Polysorbat 20, 0,01 % Massenanteil (5.16), in ein 2-ml-Zentrifugenglas (6.12) pipettiert. Es werden 40 µl der verdünnten Lösung zur Kontrolle des Phytasegehalts (9.2.2) hinzugefügt. Die Probe wird gemischt. Die Lösungen werden 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Es werden 0,8 ml auf 37 °C vorgewärmte Phytatsubstrat-Lösung (5.18) hinzugefügt. Die Inkubationszeit beträgt exakt 30 min bei 37 °C. Nach 30 min werden 0,8 ml des Stopp-Reagens (5.13) hinzugefügt und gemischt. Die Lösung wird 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und diese wird dann 3 min bei 11 000 *g* bis 20 000 *g* zentrifugiert. *D*(415) der klaren, überstehenden Flüssigkeit wird gemessen.

Für die Blindwertlösungen zur Kontrolle des Phytasegehalts werden 360 µl Acetatpuffer (5.15) in ein 2-ml-Zentrifugenglas (6.12) pipettiert. Es werden 40 µl der verdünnten Lösung zur Kontrolle des Phytasegehalts (9.2.2) hinzugefügt. Die Reihenfolge der Zugabe der Lösungen unterscheidet sich von der bei den Bestimmungen angewandten Reihenfolge. Die Blindwertlösungen werden 5 min bei 37 °C vorinku-