

KONTROLA KAKVOĆE MULTIENZIMSKOG PRIPRAVKA

QUALITY CONTROL OF THE MULTIENZYMATIC PREPARATION

I. Groš, S. Gamulin, Branka Marković-Devčić, I. Marković, D. Marković, Lina Bačar-Huskić, N. Vranešić

Pregledno znanstveni članak
UDK: 636.085:16.
Primljeno: 21. travanj 1997.

SAŽETAK

Enzimi se dodaju krmnim smjesama radi povećanja probavne sposobnosti životinja, razgradnje specifičnih polisaharida, ovojnica biljnih stanica i bjelančevina, te razgradnje antinutritivnih tvari. Primjena enzima odražava se u poboljšanju nutritivne vrijednosti krmnih smjesa, a rezultat je povećana produktivnost i ekonomična proizvodnja mesa.

Multienzimski pripravak sadrži β -glukanazu, α -amilazu i alkalnu proteinazu te prateće enzime celulazu, ksilanazu i neutralnu proteinazu. Pojedini enzimi dobiveni su biosintetskim putem pomoću mikroorganizama *Aspergillus niger* i *Bacillus subtilis*, a njihovi praškasti oblici umiješani su u multienzimski pripravak za dodatak krmnim smjesama.

Enzimске aktivnosti su praćene pouzdanim analitičkim metodama tijekom biosinteze pojedinih enzima izdvajanja enzima iz fermentiranih podloga, prevođenja u praškasti oblik i kontroli gotovog pripravka. β -glukanazna aktivnost određivana je analizom reducirajućih ugljikohidrata po metodi Somogyi-Nelson nakon hidrolize β -glukana ječma, α -amilaza određivana je metodom "dekstrinizacije" topljivog škroba (Px metoda), a alkalna proteinaza metodom razgradnje kazeina (Delft metoda).

Analitičko određivanje aktivnosti enzima u krmnim smjesama otežano je zbog relativno malih koncentracija pojedinih enzima (do 0,1%) i velikog sadržaja ugljikohidrata i aminokiselina. Alkalna proteinaza određivana je standardnom metodom, ali za enzime β -glukanazu i α -amilazu razvijene su nove gel difuzijske metode određivanja. Analitičkom kontrolom svih faza proizvodnje multienzimskog pripravka kao i skladištenja omogućeno je ostvarivanje dobrih reproducibilnih rezultata u hranidbi životinja.

UVOD

Industrijska proizvodnja stočne hrane za uzgoj životinja postavlja visoke zahtjeve u smislu kakvoće, profitabilnosti, iskoristivosti i primjenjivosti. Najčešća hrana za tov domaćih životinja sadrži žitarice (kukuruz, ječam, pšenicu, zob) i sačme

uljarica (suncokret, soju) uz dodatak aminokiselina, vitamina i minerala.

Mr. Ivan Groš, mr. Stjepan Gamulin, mr. Branka Marković-Devčić, dr. Ivan Marković, mr. Darko Marković, mr. Lina Bačar-Huskić, mr. Nenad Vranešić, PLIVA d.d. Istraživački institut, Prilaz baruna Filipovića 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

Enzimi u multienzimskom pripravku su prirodni katalizatori bjelančevinaste građe, a dobiveni su biosintezom pomoću mikroorganizama *Aspergillus niger* i *Bacillus subtilis* te njihova primjena u hranidbi životinja nema negativni utjecaj na okoliš. Dodatak enzima krmnim smjesama omogućuje povećanje probavne sposobnosti životinja (Mul i Bonte, 1995.), bolju razgradnju specifičnih polisaharida, ovojnica biljnih stanica i bjelančevina (Huyghebaert, 1995.) te antinutritivnih tvari i hranjivih sastojaka, niže hranidbene vrijednosti, odnosno probavljivosti. Kinetika probave i apsorpcija škroba, bjelančevina, lipida, neškrobnih polisaharida (Non Starch Polysaccharides-NSP) i proizvodnja bio aktivnih mono i oligomera važan je parametar u određivanju ukupnog učinka enzima (Mul i Bonte, 1995.). Primjena enzima pri uzgoju životinja omogućuje povećanu produktivnost i ekonomičniju proizvodnju mesa.

Proizvodnja enzima (tijek biosinteze, izdvajanje, iz faze fermentiranih podloga, prevođenje u praškasti oblik), kao i priprava multienzimskog pripravka (MEP-a) podvrgnuti stalnom analitičkom praćenju kakvoće i uključuje se u model integralnog sustava osiguranja kakvoće u tvornici Pliva. Taj se sustav počeo razvijati već 1935. godine počevši od prvog analitičkog laboratorija do današnjeg ZOJ Osiguranja kvalitete (1989.). Godine 1980. uvode se u poslovanje Plive principi Dobre proizvođačke prakse (DPP), te na uzorima iz Europske ekonomske zajednice i američke regulative uspostavljen je 1992. godine "Plivin model integralnog sustava osiguranja kvalitete" u proizvodnji farmaceutskih sirovina i lijekova. Cilj je tog sustava osigurati kakvoću rada u svim poslovnim funkcijama koje su uključene u bilo koju fazu nastajanja i života proizvoda, a predstavlja strateški čimbenik konkurentnosti (Smojver 1995.). Postupkom kontrole omogućena je priprava konačnog proizvoda s točno zadanom kakvoćom, što je potvrđeno u pokusima tova pilića i prasadi (Branka Marković Devčić i sur., 1995.).

ENZIMI

Multienzimski pripravak (MEP) namijenjen hranidbi domaćih životinja sadrži enzime koji su proizvedeni biosintezom vlastitim postupcima u tvornici Pliva i to β -glukanazu, α -amilazu i alkalnu

proteinazu te prateće enzime celulozu, ksilanazu i neutralnu proteinazu. Svi su ovi enzimi u multienzimskom pripravku u praškastom obliku.

β -glukanaza, enzim iz grupe hidrolaza, dobiva se biosintezom pomoću mikroorganizma *Aspergillus niger* u submerznom uzgoju. Razgrađuje linearne polisaharide β -glukane građene od glukoznih jedinica povezanih 1,3 i 1,4 β -D-glukozidnim vezama. U žitaricama (ječam, pšenica, raž, zob) se β -glukan nalazi u staničnoj stijenci endosperma zrna. Razgradnjom β -glukana ječma nastaju glukoza, celobioza, laminaribioza, fruktoza i viši oligosaharidi, koji se mogu odrediti metodom tankoslojne kromatografije na silikagelu (Suzana Joveva i sur., 1985.). Razgradnjom endosperma zrna omogućen je amilazama i proteinazama lakši pristup do škrobnih zrnaca i bjelančevinastog dijela zrna (Pettersson i Aman, 1989.).

α -amilaza je enzim koji također spada u skupinu hidrolaza, a dobiva se biosintezom pomoću mikroorganizma *Bacillus subtilis* u submerznom uzgoju. Razgrađuje 1,4 α -D-glukozidne veze u škrobu i škrobnim sirovinama stvarajući topljive oblike oligosaharida, dekstrina i reducirajuće ugljikohidrate (maltoza) te na taj način povećava hranjivu i energetska vrijednost hrane (Ferket, 1996.). Produkti hidrolize određivani su kao reducirajući ugljikohidrati fericijanid metodom prema Hoffmanu (Hoffman, 1937.).

Alkalna proteinaza spada u grupu proteolitičkih enzima i također se dobiva biosintezom pomoću mikroorganizma *Bacillus subtilis*, u submerznom uzgoju. Razgrađuje peptidne veze biljnih i životinjskih bjelančevina do peptida i aminokiselina, koji se lakše resorbiraju u crijevnoj sluznici, te se na taj način povećava probavna sposobnost životinja (Ferket, 1996.). Razgradnja ječma s alkalnom proteinazom do endopeptidaza, egzopeptidaza, dipeptidaza i aminokiselina praćena je određivanjem nastalog α -amino dušika (Sanger, 1945.) koji je mjerilo stupnja konverzije bjelančevina.

ANALITIČKE METODE

Analitičko određivanje aktivnosti enzima tijekom proizvodnje MEP-a

Enzimi mogu biti u tekućem ili krutom (praškastom) obliku i njihove se enzimске aktivnosti

određuju pouzdanim analitičkim metodama. Poznato je da se enzimi tijekom primjene deaktiviraju, što ovisi o temperaturi, pH vrijednosti, koncentraciji supstrata ili nekim drugim čimbenicima. Da bi se izbjegao utjecaj deaktivacije na rezultate kod analitičkog određivanja aktivnosti enzima, izvođenje reakcija se propisuje kod znatno nižih temperatura od optimalne uz kratko vrijeme inkubacije (Marković i sur., 1989.). Kod primjene enzima u realnim uvjetima hranidbe životinja također dolazi do gubitka dijela enzima. Doze enzima koje su utvrđene na osnovi pokusa hranidbe životinja, tako su odmjerenе da taj gubitak ne utječe na njihovu učinkovitost.

β-glukanaza

Postupak određivanja β-glukanazne aktivnosti uključuje hidrolizu ječmenog β-glukana i određivanje nastalih reducirajućih ugljikohidrata. Prikladno razrijeđeni uzorak enzima inkubira se 30 minuta u 0,5%-tnoj otopini β-glukana u 0,05 M fosfat-citrat puferu pH 5,0 pri 30° C. Reakcija se zaustavlja dodatkom bakrenog reagensa (Somogyi, 1952.), a reducirajući ugljikohidrati izraženi kao glukoza određuju se Nelsonovom metodom (Nelson, 1944.). Istovremeno se određuju i reducirajući ugljikohidrati u enzimskoj otopini slijepe probe. Razlika sadržaja reducirajućih ugljikohidrata nastalih hidrolizom i slijepe probe uzorka predstavlja mjeru β-glukanazne aktivnosti. Alternativno, aktivnost je određivana i na automatskom analizatoru (TRAACS 800 tvrtke Bran+Luebbe, Njemačka).

Definicija jedinice:

Jedna jedinica β-glukanaze je ona aktivnost enzima koja pod uvjetima određivanja katalizira oslobađanje reducirajućih ugljikohidrata izraženih kao glukoza, brzinom od 1 μmol min⁻¹.

α-amilaza

α-amilazna aktivnost određuje se modificiranom S.K.B. metodom (Sandstedt i sur., 1939.; Anon, 1972.). Određivanje se osniva na brzini razgradnje topljivog škroba do graničnih dekstrina. Uzorak enzima se inkubira u 1,82%-tnoj otopini škroba u fosfatnom puferu pH 6,0 pri 30° C uz povremenu kontrolu uzorka s J₂-KJ reagensom i mjerenjem ekstinkcije kod 617 nm. Interpolacijom se odredi vrijeme kod kojeg ekstinkcija iznosi 0,800 (vrijeme

"dekstrinizacije"), a na osnovi tog vremena izračuna enzimska aktivnost. Alternativno, aktivnost je određivana i na automatskom analizatoru (TRAACS 800 tvrtke Bran+Luebbe, Njemačka).

Definicija jedinice:

Pripravak ima aktivnost od 1 Xs j g⁻¹ kada 250 mg pripravka reagira s 1 g suhe težine škroba u ukupnom volumenu od 55 mL pri temperaturi od 30° C, kod pH 6,0 tako da je "dekstrinizacija" postignuta u 15 minuta.

Alkalna proteinaza

Proteinazna aktivnost u alkalnom području određuje se metodom razgradnje kazeina prema Delft-u (Anon.: 1967.). Uzorak se inkubira 30 minuta pri 40° C uz kazein kao supstrat u tris puferu pH 8,5, a tijekom hidrolize supstrat se razgrađuje na manje fragmente. Reakcija se zaustavlja dodatkom trikloroctene kiseline koja taloži nerazgrađeni kazein i njegove veće fragmente. Talog se uklanja filtriranjem, a koncentracija u trikloroctenoj kiselini topljivih fragmenata mjeri se kod 280 nm. Alternativno, aktivnost je određivana i na automatskom analizatoru (TRAACS 800 tvrtke Bran+Luebbe, Njemačka).

Definicija jedinice:

Pripravak ima proteolitičku aktivnost od 1000 j g⁻¹ ako 1 mL 2% otopine enzimskog pripravka pod uvjetima određivanja aktivnosti daje razliku optičke gustoće glavne i slijepe probe 0,400.

Analitičko određivanje aktivnosti enzima u krmnim smjesama

Multienzimski pripravak umiješa se u krmnu smjesu u koncentraciji od 0,1% (1 kg na 1000 kg). Dok se alkalna proteinaza može odrediti standardnom metodom, određivanje enzima β-glukanaze i α-amilaze u tako pripremljenim krmnim smjesama bitno je otežano ili je nemoguće izvoditi standardnim metodama zbog relativno malih koncentracija enzima i velikog sadržaja ugljikohidrata i aminokiselina. Za određivanje ovih enzima primjenjuju se gel-difuzijske metode.

Enzimski supstrati se otapaju ili suspendiraju u mediju pogodnom za stvaranje gela kao što su agar ili želatina. U rupice izbušene u gelu stavlja se otopina enzima te nakon difuzije i hidrolize supstrata otkrivaju zone gdje se odvijala enzimska hidroliza. Za utvrđivanje aktivnosti pojedinih

uzoraka enzima potreban je standard koji se nanosi u nekoliko različitih koncentracija. Mjerenjem zona i njihovim uspoređivanjem sa standardom određuju se aktivnosti nepoznatih uzoraka.

α -amilaza

α -amilazna aktivnost određuje se na principu difuzije otopine α -amilaze i hidrolize škroba na škrob-agarnim pločama. Gel sadrži 2% agara, 1% škroba, 0,05% CaCl₂ i 0,6% NaCl. Rastaljeni gel se razlije na ploče za biološku titraciju tako da debljina sloja iznosi 3-4 mm. U izbušene rupe promjera 7 mm i međusobno udaljene 40 mm pipetiraju se otopine standarda α -amilaze aktivnosti 10⁻⁴ do 1 Xs j mL⁻¹, a u preostale rupe otopine nepoznatih uzoraka. Difuzija i hidroliza traju nekoliko sati pri 37 °C, a nakon toga se ploča prelije reagensom J2-KJ. Nerazgrađeni škrob oboji se tamno plavo, a zona razgrađenog škroba ostaje bezbojna. Iz izmjerenih promjera zona i koncentracija standarda nacrt se baždarna krivulja, koja služi za izračunavanje aktivnosti nepoznatih uzoraka. (Slika 1.)

β -glukanaza

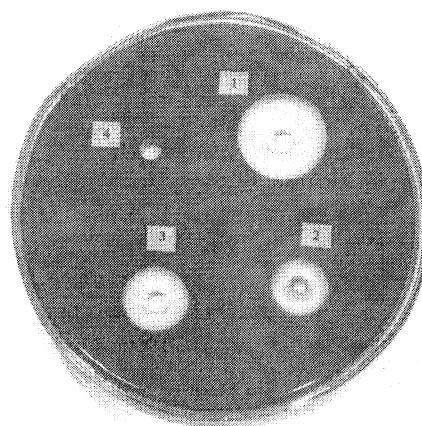
β -glukanazna aktivnost određuje se na principu difuzije otopine enzima i hidrolize β -glukana na β -glukan-agarnim pločama. Gel sadrži 2% agara i 0,5% β -glukana u 0,05 M fosfat-citrat puferu pH 5,0. U sloju gela debljine 4 mm izbuše se rupe promjera 9 mm u koje se pipetira 0,05 mL razrijeđenog enzima. Otopine standarda β -glukanaze priređuju se u koncentracijama 10⁻² do 1 j mL⁻¹. Nakon 4 sata difuzije i hidrolize pri 40° C, ploče se preliju s 0,2%-tnom otopinom kongo-crvene boje. Nerazgrađeni β -glukan se oboji crveno, a razgrađeni β -glukan ostaje bezbojan. Iz izmjerenih promjera zona i uz pomoć baždarene krivulje standarda izračunava se enzimska aktivnost uzorka (Slika 2.).

Celulaza

Celulolitička aktivnost određuje se suspendiranjem 0,5% plavo obojene mikrokristalinične celuloze (remazolbrilant plavi avicel) u citratnom puferu pH 5,0 uz dodatak 2% agara. Prilikom hidrolize obojene mikrokristalinične celuloze kroz

16 sati pri 50° C oslobađa se plava boja. Veličina plavih zona oko mjesta dodavanja celulaza ovisi o enzimskim aktivnostima uzorka. Mjerenjem plavih zona razgrađene celuloze uz pomoć baždarne krivulje standarda u koncentracijama 1 do 10 j mL⁻¹, izračunavaju se enzimskie aktivnosti nepoznatih uzoraka. (Slika 3.).

Primijenjene gel-difuzijske metode na pločama za određivanje β -glukanaze i α -amilaze prikazane su na slikama 1 i 2. Metode su relativno jednostavne, ne traju dugo, ali ne daju toliku točnost kao standardne metode. Na slici 3 također je prikazano određivanje enzima celulaze primjenom gel- difuzijske metode.

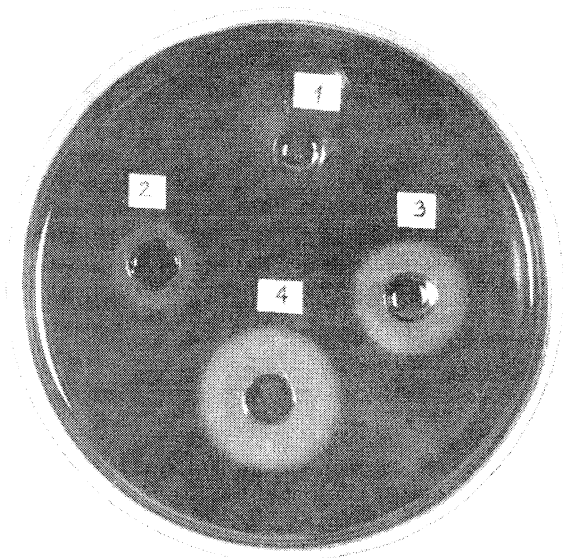


Slika 1. Određivanje koncentracije enzima α -amilaze u krmnoj smjesi na škrob-agarnoj ploči.

- plava boja: nerazgrađeni škrob
- bijela zona: škrob razgrađen s α -amilazom
- 1. standard α -amilaze 1 Xs mL⁻¹
- 2. krmna smjesa (1 kg MEP-a na 1000 kg)
- 3. MEP
- 4. krmna smjesa bez dodatka enzima

Fig. 1. Determining α -amylase concentration in the feedstuff on the starch-agar plate.

- blue colour: undegraded starch
- white zone: starch hydrolysed using α -amylase
- 1. standard α -amylase 1 Xs mL⁻¹
- 2. feedstuff (1kg MEP on 1000 kg)
- 3. MEP
- 4. feedstuff without enzymes



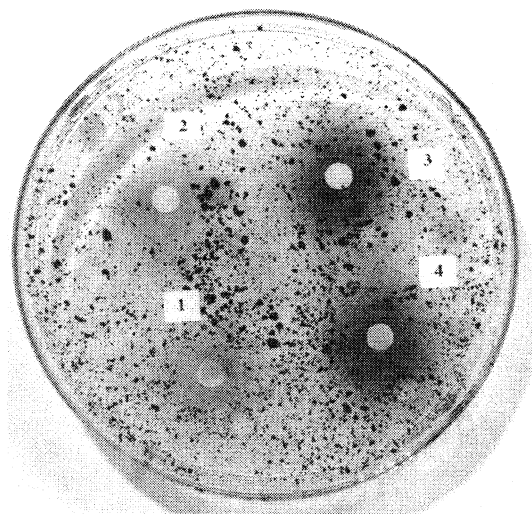
Slika 2. Određivanje koncentracije enzima β -glukanaze u krmnoj smjesi na β -glukan-agarnoj ploči.

- crvena boja: nerazgrađeni β -glukan
- bijela zona: β -glukan razgrađen s β -glukanazom
- 1. krmna smjesa bez dodatka enzima
- 2. krmna smjesa (1 kg MEP-a na 1000 kg)
- 3. standard β -glukanaze 0,1 j mL⁻¹
- 4. standard β -glukanaze 1 j mL⁻¹

Fig. 2. Determining β -glucanase concentration in the feedstuff on the β -glucan-agar plate.

- red colour: undegraded β -glucan
- white zone: β -glucan hydrolysed using β -glucanase
- 1. feedstuff without enzymes
- 2. feedstuff (1 kg MEP on 1000 kg)
- 3. standard β -glucanase 0,1 j mL⁻¹
- 4. standard β -glucanase 1 j mL⁻¹

Primijenjene analitičke metode za kontrolu kakvoće pripravka jednostavne su i relativno brze i za primijenjene uvjete rada dobre. Uz te metode primijenjene su i druge analitičke metode za određivanje nastalih proizvoda hidrolize, koji su bili pokazatelj učinkovitosti enzima. Na tablici 1 dan je prikaz proizvodnje multienzimskog pripravka i primijenjenih analitičkih metoda u kontroli enzimskih



Slika 3. Određivanje koncentracije enzima celuloze na agarnoj ploči s plavo obojenom mikrokristaliničnom celulozom.

- bijela podloga s plavim zrnima: nerazgrađena obojena celuloza u agaru
- plava zona: celuloza razgrađena s celulozom
- 1. celuloza 1 FPj mL⁻¹
- 2. celuloza 2 FPj mL⁻¹
- 3. celuloza 5 FPj mL⁻¹
- 4. celuloza 10 FPj mL⁻¹

Fig. 3. Determining cellulase concentration in the feedstuff on the blue microcrystalline cellulose-agar plate.

- white transparent medium with blue grains: undegraded coloured cellulose in agar
- blue zone: cellulose hydrolysed using cellulase
- 1. cellulase 1 FP j mL⁻¹
- 2. cellulase 2 FP j mL⁻¹
- 3. cellulase 5 FP j mL⁻¹
- 4. cellulase 10 FP j mL⁻¹

aktivnosti po fazama i operacijama. Analitičkom kontrolom svih faza proizvodnje kao i skladištenja multienzimskog pripravka omogućeno je ostvarivanje dobrih reproduktivnih rezultata u hranidbi životinja. Rezultati pokusa su potvrdili da je upotreba Plivinog multienzimskog pripravka (MEP-a) opravdana, a prema podacima u literaturi može se svrstati u sam vrh djelotvornosti.

Tablica 1. Prikaz proizvodnje multienzimskog pripravka i primjene analitičkih metoda određivanja enzimskih aktivnosti**Table 1. Presentation of the multienzymatic preparation production and the application of enzyme activity analytical methods**

Faza postupka	Operacija	Primjenjivanje određivanja enzimске aktivnosti				
		β-glukanaza		α-amilaza		alkalna proteinaza
		stand. metoda	gel difuz. metoda	stand. metoda	gel difuz. metoda	stand. metoda
Biosinteza pomoću mikroorganizama: A. niger, B. subtilis	Fermentacija		+		+	+
Priprema preparata za dobivanje praškastog oblika	Filtracija Ultrafiltracija Uparavanje Konzerviranje		+		+	+
Dobivanje praškastog enzima	Sušenje raspršivanjem Homogenizacija Pakiranje Skladištenje		+		+	+
Umiješanje enzima u biljni nosač	Umiješanje Skladištenje		+		+	+
Umiješavanje MEP-a u stočnu hranu	Umiješavanje Skladištenje		+		+	+

LITERATURA

- Anon., (1972): "Bacterial Alpha Amylase and Bacterial Proteinase", ABM Industrial Product Limited, Wintrop, England.
- Ferket, P.R. (1996): Enzymes offer way to reduce waste, improve performance, Feedstuffs, 22, 30-34.
- Hoffman, W.S. (1937): A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine, J. Biol. Chem. 120, 51-55.
- Huyhebaert, G. (1995): The bio-efficacy of carbo (NSP)-enzymes in poultry diets, The second European Symposium on Feed Enzymes, Proceedings of ESFE 2, Noordwijkerhout, Netherland 25-27 October 1995. str. 52-57.
- Joveva, Suzana, Branka Marković-Devčić, I. Marković (1985): Razdvajanje glukoze, celobioze i laminaribioze u hidrolizatu β-glukana ječma tankoslojnom kromatografijom, Prehrambeno-tehnol. rev., 23 (4) 149-152.
- Marković, I., Branka Marković-Devčić, Ivanka Sorić, Stojanka Radeka (1989): Svojstva i primjena fungalne β-glukanaze u pivarstvu, Pivarstvo 22 (2) 79-85.
- Marković-Devčić, Branka, S. Bogdan, I. Groš, N. Vranešić, Lina Bačar-Huskić, B. Prester, T. Horvat, I. Marković, I. Friganović, B. Stuburić (1995): Multienzymatic Preparation for Animal Nutrition, Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev. 33 (2-3) 123- 126.
- Anon., (1967): "Mexatase proteolytic enzyme product as additiva in washing compounds" Royal Netherlands, Fer, Ind. LTD. Delft, Holland.
- Mul, A. J., A. W. Bonte (1995): New elements in the physiological mode of action of feed enzymes, The second European Symposium on Feed Enzymes, Proceedings of ESFE 2, Noordwijkerhout, Netherland 25-27 October 1995. 52-57.
- Nelson, N. (1944): A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, J. Biol. Chem. 153, 375-380.
- Petterson, D., P. Aman (1989): Enzyme supplementation of a poultry diet containing rye and wheat, Brit. J. Nutr. 62, 139-149.
- Sandstedt, R.M., E. Kneen, M. J. Blish (1939): A standardized Wholgemuth procedure for α-amylase activity, Cereal. Chem. 16, 712-723.
- Sanger, F. (1945): Free amino groups of insulin, Biochem. J. 39, 507-515.
- Somogyi, M. (1952): Notes on sugar determination, J. Biol. Chem. 195, 19-23.
- Smojver, Dubravka, (1995): Plivin sustav osiguranja kvalitete, Praxis veterinaria 43(1- 2) 3-13.

SUMMARY

The enzymes are added into the feedstuffs to advance the animal digestive capacity, the degradation of specific polysaccharides, plant cell membranes and proteins. They also degrade so-called antinutritive factors and nutritive stress factors. The enzyme use increases the feedstuff nutritive value and also results in increased productivity and economical meat production.

The multienzymatic preparation contains enzymes: β -glucanase, α -amylase and alkaline proteinase with accompanied cellulase xylanase and neutral proteinase activities. Some enzymes are obtained biosynthetically from microorganisms *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis* and their powder forms are mixed into the multienzymatic preparation for to be added into the feedstuffs. The enzyme activities are accompanied by reliable analytical methods during enzyme biosynthesis, the isolation from fermentation broths, preparation of the powder forms and the quality control of the final preparation.

β -glucanase activity is determined by reducing sugar analysis applying the Somogyi-Nelson method after barley β -glucan hydrolysis. α -amylase activity is determined using the soluble starch "dextrinisation" method (Px method) and alkaline proteinase is determined by the casein hydrolysis method (Delft method).

Enzyme activities added into the feedstuffs are difficult to analyze because of low enzyme concentrations (0,1%) and high carbohydrate and amino acid contents. Alkaline proteinase can be determined by the standard method but for the enzymes β -glucanase and α -amylase new gel-diffusion methods are developed. Analytical quality control of all phases in the multienzymatic preparation production and storage period enabled good reproducible results in animal feeding.

EKOLOŠKO ČIST UTOVAR KAMIONSKIH CISTERNI I OTVORENIH KAMIONA

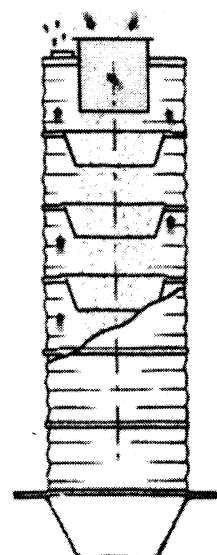
MODUFLEX

TELESKOPSKA CIJEV I FLEKSIBILNI UTOVARNI MIJEH
REDUCIRAJU PRAŠINU, SMANJUJU RASIPANJE
MATERIJALA I POBOLJŠAVAJU RADNU OKOLINU.

**MODULNA KONSTRUKCIJA I ŠIROK IZBOR
RAZLIČITOG PRIBORA.**

Javite nam se, da Vam pošaljemo prospektni materijal

DENCO Engineering & Trade Co. Ltd.
P.O. box 185, Zihlerlova 2
SLO-1001 Ljubljana
Tel.: +386 61 125 32 10 Fax.: +386 61 125 32 37



 [®]
MODUFLEX

*Successful career guaranteed.
Garantiran uspješan razvoj.*

Choline Chloride
Food for Feed

Kolin Klorid
Hrana za stočnu hranu


AKZO NOBEL

Akzo Nobel has sales offices worldwide. Call us for the nearest address or for a product brochure.

Akzo Nobel Chemicals bv, P.O. Box 247, 3800 AE Amersfoort, The Netherlands, Tel. +31 33 467 67 52, Fax +31 33 467 61 18

Akzo Nobel ima prodajne urede širom svijeta. Obratite nam se za adresu najbližeg ili za našu brošuru.

Merkantile d.d. Zagreb, Svacičev trg 5, Tel. (01)457 73 55, Fax (01)457 72 65