

## Analyse rapport ORAC Europe BV

*Paraaf  
onderzoeker*

Naam opdrachtgever:

Hak Agrofeed BV  
t.a.v. Dhr. B. Hak  
Leemansstraat 2  
4251 LD Werkendam

Aantal aangeleverde  
monsters:

6 monsters

*EW*

Aankomstdatum monster(s):

Dinsdag, 16 september 2008

*EW*

Toestand van monster  
bij aanlevering:

OK:  *beschadigd*:  anders:  (zie opmerkingen)

Monster-opslag:

Monsters werden direct na aankomst in  
het donker en bij 4°C opgeslagen.

*EW*

Opmerkingen:

Monsters werden aangeleverd als  
individueel verpakte komkommers.

*EW*

Monster informatie  
verstrekkt door  
opdrachtgever:

De aangeleverde komkommers waren verdeeld in twee groepen: een controle groep (n=3) en een met Immutines behandelde groep (n=3). De controle groep bestond uit onbehandelde komkommers.

Controle komkommers werden genummerd C-1, C-2 en C-3. Immutines-behandelde komkommers werden genummerd I-1, I-2 and I-3.

Alle komkommers werden gekweekt in de kwekerij van W. Limburg BV te IJsselmuiden.

**Nadere details aangaande het kweekproces en aanvullende informatie over Immutines worden weergegeven in Appendix A, dat bijgevoegd is aan het eind van dit rapport.**

ORAC Europe  
monster voorbereiding:

Van elke komkommer werd vooraf het gewicht bepaald.

Vervolgens werd exact uit het midden van elke komkommer een stuk gesneden van zoveel mogelijk gelijke grootte ( $\pm 5$  cm). Van elk uitgesneden stuk werden het gewicht en het volume bepaald (zie resultaten, pag. 5).

Gebruikmakend van een speciale laboratorium maler werd elk stuk komkommer individueel grondig vermalen.

Van elk resulterend homogenaat werd 2.5 gram afgewogen in een glazen reageerbuis. Om de hydrofiele inhoudstoffen uit deze homogenaten te extraheren werd aan elke buis 10 mL van een mengsel van aceton, water en azijnzuur (140:59:1, v/v) toegevoegd. Dit mengsel (afgekort als AWA) wordt standaard gebruikt om hydrofiele inhoudsstoffen uit ondermeer voedselmonsters te extraheren.

Na toevoegen van 10 mL AWA werden de afgesloten reageerbuizen 15 minuten lang in een ultrasoon bad geplaatst.

Hierna werden alle buizen gedurende 1 minuut grondig gemengd op een zgn. vortex, waarna de buizen opnieuw voor 15 minuten in een ultrasoon bad werden geplaatst.

Na nog een laatste keer goed mengen, werden de buizen in een centrifuge gedurende 15 minuten afgedraaid (800 x g).

De supernatanten van elke buis werden zorgvuldig afgepipetteerd en in bruin-glazen flesjes opgeslagen in het donker bij 4°C, tot het moment van testen in de hydrofiele ORAC test.

*paraaf  
onderzoeker*

Datum monster voorbereiding:

Dinsdag 16 september 2008

*EW*

Gewenste test:

**Hydrofiele ORAC assay**

*EW*

Test datum:

Woensdag 17 & donderdag 18  
september 2008

*EW*

Verantwoordelijke  
onderzoeker:

Dr. E. van den Worm

*E. van den Worm*

*EW*

Datum eindrapportage:

Dinsdag, 23 september 2008

*EW*

Opmerkingen:

- geen opmerkingen -

*EW*

### Korte beschrijving van de uitgevoerde test(en):

De door Hak Agrofeed BV aangeleverde monsters werden getest op hun antioxidant capaciteit in de hydrofiële ORAC test (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Bij deze gestandaardiseerde en gevalideerde test wordt gebruik gemaakt van fluoresceïn als een fluorescente probe en van AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride) als een fysiologisch relevante bron van peroxy radicalen. Het fluorescentie profiel werd in de tijd gevolgd met behulp van een geautomatiseerde fluorescentie reader (*Thermo Fluoroskan Ascent*). Fluorescentie werd gedurende een uur elke minuut gemeten en de gehele meting vond plaats bij 37°C. Bij de metingen werd gebruik gemaakt van een excitatie golflengte van 485 nm en een emissie golflengte van 538 nm.

In de ORAC test wordt Trolox (een wateroplosbare vorm van vitamine E) gebruikt als een interne standaard. Daarom worden resultaten van de ORAC test (de gevonden ORAC waarden) uitgedrukt in  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalenten (TE) **per 100 g van het testmonster**. Dit is een standaard manier van het uitdrukken van ORAC waarden.

Direct voorafgaand aan de meting werden alle monsters opgelost en doorverdund in vers geprepareerde natriumfosfaat buffer (75mM, pH = 7.4).

Direct voorafgaand aan de ORAC meting werden alle gebruikte reagentia vers bereid. De AAPH oplossing werd in het donker en op ijs bewaard tot gebruik in de ORAC test. Alle andere te gebruiken oplossingen werden in het donker bij 37°C bewaard.

De uiteindelijke ORAC waarden werden berekend uit de verkregen experimentele data door gebruik te maken van de zgn. 'area under the curve' (AUC) methode. De netto AUC werd berekend door de AUC van de blanco af te trekken van de AUC van het geteste monster. De uiteindelijke ORAC waarde (uitgedrukt in Trolox equivalenten) werd berekend door extrapolatie van de verkregen Trolox calibratie curve ( $\text{AUC}_{\text{Trolox}}$  vs. [Trolox]).

ORAC waarden werden uitgedrukt als gemiddelde waarde (gem.)  $\pm$  standaard deviatie (S.D.).

### Opmerkingen:

Bij alle verdunningsstappen en voor het uiteindelijke uitpipetteren in de meetplaat, werden alle monsteroplossingen grondig gemengd door alle reageerbuizen op een vortex te plaatsen.

## TEST RESULTATEN:

Komkommer nr.	Totaal gewicht	Gewicht (deel)	Volume (deel)
C-1 (controle)	400.56 g.	64.10 g.	62 cm <sup>3</sup>
C-2 (controle)	386.52 g.	64.50 g.	59 cm <sup>3</sup>
C-3 (Controle)	411.85 g.	65.17 g.	63 cm <sup>3</sup>
I-1 (immutines)	358.50 g.	63.80 g.	62 cm <sup>3</sup>
I-2 (immutines)	345.30 g.	63.85 g.	62 cm <sup>3</sup>
I-3 (immutines)	375.53 g.	64.82 g.	63 cm <sup>3</sup>

	ORAC waarde (µmol TE / 100 g.)	
<b>Controle komkommers</b>	<b>99.13 ± 5.38 (gem. ± S.D.)</b>	(n = 4)
<b>Immutines-behandelde komkommers</b>	<b>105.15 ± 7.30 (gem. ± S.D.)</b>	(n = 4)

\* Zoals eerder vermeld, zijn alle ORAC waarden uitgedrukt in µmol TE per 100 g monster. Indien gewenst kunnen deze ORAC waarden eventueel doorgerekend worden tot µmol TE per komkommer of µmol TE per standaard portie.

	Antioxidant capaciteit (% van controle)	Toename in antioxidant capaciteit (relatief t.o.v controle)
<b>Controle komkommers</b>	<b>100</b>	<b>-</b>
<b>Immutines-behandelde komkommers</b>	<b>108.66 ± 4.82</b>	<b>8.66 %</b>

Eindverantwoordelijke:

Dr. E. van den Worm  
(CEO, ORAC Europe BV)

(e-mail: E.vandenworm@uu.nl)



- **ORAC Europe BV** • PO BOX 80082 • 3508 TB Utrecht • The Netherlands •
- Rabobank: 12 77 66 456, Utrecht • IBAN: NL41RABO 0127 7664 56 •
- BIC: RABONL2u • KvK 30222065 • VAT nr. NL8174.77.615.B01 •
- Tel: 00 31(0)302535933 • Fax:00 31(0) 302536941 •
- e-mail: [info@orac-europe.com](mailto:info@orac-europe.com) •
- [www.orac-europe.com](http://www.orac-europe.com) •

## APPENDIX A

**NB. De volgende informatie is aangeleverd door de opdrachtgever en valt buiten de verantwoordelijkheid van ORAC Europe BV.**

### ***Immutines:***

'Immutines' is een verzamelbegrip waaronder alle essentiële, in de natuur voorkomende elementaire stoffen vallen die de immuniteit van levende organismen stimuleren.

Om als dusdanig geïdentificeerd te kunnen worden, moeten immutines de vorm hebben van co-factoren, niet-eiwitgebonden groepen, elementen in een overgangsfase of monomeren. Sommige vormen stimuleren, direct of indirect, het immuunsysteem en groeifactoren. Andere vormen katalyseren de productie van antioxidanten.

D&H ontdekte deze groep van verbindingen in zeewater. Drogen, mechanisch of chemisch extraheren met het doel ze te winnen, leidt uitsluitend tot de vernietiging van deze immutines.

Een tekort aan immutines in de grond leidt tot deficiënties en ziekten bij planten. Een tekort aan specifieke, voor dieren voedzame, immutines in de grond doet de planten misschien wel geen kwaad, maar zonder deze specifieke immutines ontwikkelen dieren die zich uitsluitend voeden met deze planten deficiënties, ziekten en een lager antioxidant-niveau. Tijdens de productie van planten worden ongeveer zestien elementen in de vorm van kunstmest toegediend. Planten, dieren en mensen hebben echter nog zo'n 55 andere elementen nodig. Indien er niet voldoende immutines aanwezig zijn, kan de microflora in de grond onvoldoende gedijen. Praktisch alle elementen zijn noodzakelijk en essentieel voor de metabolische processen, oftewel groei en immuniteit. Indien deze elementen afwezig zijn, kunnen plant, dier en mens hun levenscyclus (groei en reproductie) niet afmaken.

De specifieke, structurele, fysiologische en biochemische eigenschappen van ieder element kunnen niet vervangen worden door enig ander onderdeel. Ieder element is uniek en direct of indirect betrokken bij het metabolisme (als onderdeel van een enzym of een cellulair organisch onderdeel). Planten, dieren en mensen zijn afhankelijk van deze elementen, oftewel van immutines.

De element analyse van de gebruikte *Immutines* formulering staat weergegeven op pagina 4.

## Details van kweekomstandigheden komkommers:

De aangeleverde komkommer worden op traditionele wijze gekweekt op de kwekerij van W. Limburg BV in IJsselmuiden. De kweek vindt plaats in kassen en de planten wortelen op steenwol.

Tijdens de teelt zijn de komkommers onderverdeeld in een controle groep (niet behandeld) en een met *Immutines* behandelde groep.

De kweek-omstandigheden zijn voor beide groepen gelijk, alleen de samenstelling van de bewatering verschilt per groep.

De controle groep wordt dagelijks bewaterd met een oplossing met daarin de volgende ingrediënten. (Per 20.000 liter water zijn de volgende ingrediënten aanwezig):

Kalksalpeter	175 kg.
Salpeterzuur	105 kg.
IJzerchelaat	6 kg.
Rood ijzer	3 L.
Fosforzuur	40 kg.
Kalisalpeter	150 kg.
Bitterzout	75 kg.
Mangaansulfaat	300 g.
Zinksulfaat	200 g.
Borax	600 g.
Kopersulfaat	38 g.
Natrium	24 g.
Zuurbak	30 kg.

### Controle Groep (CG):

Bovenstaand mengsel wordt tijdens de groeiperiode van de komkommers in totaal 20 maal toegediend. De gemiddelde toediening is 5 L. per m<sup>2</sup> per dag. De gemiddelde uitspoeling bedraagt ongeveer 5-10% (deze uitspoeling is ondermeer afhankelijk van het gebruik van bestrijdingsmiddelen).

### *Immutines*-behandelde Groep (IG):

Aan het bovengenoemde bewaterings-mengsel (20.000 L.) wordt tijdens de eerste 10 bewateringsbeurten in totaal 7 liter *Immutines* toegevoegd.

Na ongeveer 20 dagen wordt het mengsel met 7 liter *Immutines* vervangen door een mengsel van 9 liter *Immutines* per 20.000 L.

De gemiddelde toediening is 5 L. per m<sup>2</sup> per dag. De gemiddelde uitspoeling bedraagt ongeveer 5-10%.





**Foto 1)** Komkommers uit de controle groep (CG)



**Foto 2)** Komkommers uit de Immutines-behandelde groep (IG)

**Element analyse gegevens van  
geformuleerde Immutines:**

	PPM		PPM
Aluminum, Al	.265	Molybdenum, Mo	.157
Antimony, Sb	.056	Neodymium, Nd	.034
Argon, Ar	.315	Neon, Ne	.0001
Arsenic, As	1.437	Nickel, Ni	.062
Barium, Ba	.032	Niobium, Nb	.00023
Beryllium, Be	.016	Nitrogen, N	.5
Bismuth, Bi	-	Oxygen, O	728,450.0
Boron, B	247.892	Phosphorus, P	4.118
Bromide, Br	755.203	Polonium, Po	-
Cadmium, Cd	-	Potassium, K	602.447
Calcium, Ca	358.167	Praseodymium, Pr	.00019
Cerium, Ce	.003	Protactinium, Pa	-
Cesium, Cs	.002	Radium, Ra	-
Chloride, Cl	134,376.0	Radon, Rn	-
Chromium, Cr	.159	Rhenium, Re	.0037
Cobalt, Co	.028	Rubidium, Rb	.433
Copper, Cu	.163	Ruthenium, Ru	-
Dysprosium, Dy	.001	Samarium, Sm	-
Erbium, Er	-	Scandium, Sc	.048
European, Eu	-	Selenium, Se	4.194
Fluoride, F	.91	Silicon, Si	10.377
Gadolinium, Gd	-	Silver, Ag	.006
Gallium, Ga	.00053	Sodium, Na	6,968.9
Germanium, Ge	.00041	Strontium, Sr	4.652
Gold, Au	-	Sulfur, S	4,886.0
Hafnium	.00017	Tantalum, Ta	-
Helium, He	-	Tellurium, Te	.000147
Holmium, Ho	-	Terbium, Tb	-
Hydrogen, H	91,6300.0	Thallium, Tl	.026
Indium, In	.385	Thorium, Th	.0001
Iodine, I	60.0	Thulium, Tm	-
Iridium, Ir	.00006	Tin, Sn	.064
Iron, Fe	6.127	Titanium, Ti	.002
Krypton, Kr	-	Tungsten, W	.056
Lanthanum, La	.001	Uranium, U	.019
Lead	-	Vanadium, V	1.184
Magnesium, Mg	40,593.66	Xenon, Xe	-
Manganese, Mn	.182	Ytterbium, Yb	-
Mercury, Hg	-	Yttrium, Y	.02
		Zinc, Zn	.58
		Zirconium, Zr	.034