

## 6. Diskussion

Die Aktivitätsbestimmung von Enzymen in komplexen Proben, wie Futtermittel und Digesta, sollte mit einfachen, aber exakten Methoden weiterentwickelt werden. Dazu wurden kommerzielle Futterzusatzenzyme verwendet und zunächst charakterisiert. Die enzymatische Aktivität gegenüber Xylan und  $\beta$ -Glucan wurde über die kommerziell erhältlichen Substrate Haferspelenxylan und Lichenin bzw.  $\beta$ -Glucan bestimmt. Die Nachweisgrenze und der Meßbereich der Enzymaktivitätsbestimmung hängt von der Bestimmungsmethode und der Charge des verwendeten Substrates ab. Sie läßt sich durch Verwendung von modifizierten Substraten verbessern. Zur Empfindlichkeitssteigerung wurden die Substrate physikalisch, chemisch und biologisch modifiziert und zur Enzymaktivitätsbestimmung mit den Methoden Agardiffusionstest, Viskositätsabnahme, chromogene Substrate und Farbreaktion in Futtermitteln und Digesta verwendet.

### Charakterisierung der Enzympräparate

Die als Futterzusatzenzyme verwendeten Enzym-(Roh)-präparate ließen sich aufgrund der hier beschriebenen Untersuchungen nach ihren Hauptaktivitäten in Xylanase betonte und 1-3,1-4- $\beta$ -Glucanase betonte Enzyme einteilen. Einige Präparate zeigten hohe Nebenaktivitäten, bei anderen waren diese im Vergleich zu den Hauptaktivitäten zu vernachlässigen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß alle Enzymaktivitäten bei pH 6,0 bestimmt wurden. Die Bestimmungen erfolgten in Natriumacetatpuffer pH 6,0. Dieser pH-Wert kommt den physiologischen Bedingungen, in denen Futterzusatzenzyme eingesetzt werden nahe. Dieser Puffer hat nicht den optimalen pH-Wert für die Aktivitätsbestimmung der Präparate, seine Pufferwirkung eigentlich für Hydroxidionen ab pH 5,5 begrenzt, er wurde anfangs als allgemeiner Puffer zur Extraktion verwendet und beibehalten, damit die Ergebnisse vergleichbar blieben. Die potentielle Aktivität einer bestimmten Enzymfraktion kann unterbestimmt werden, wenn z.B. ein Enzym mit dem pH-Optimum 4,5 bei pH 6,0 untersucht wird. Es konnte gezeigt werden, daß nicht kommerzielle Enzympräparate zusätzliche NSP-hydrolysierende Aktivitäten neben den 1-3,1-4- $\beta$ -Glucanase- bzw. Xylanasehauptaktivitäten hatten. Der Vergleich der Produkte, die den gleichen Produktionsstamm haben, zeigte, daß die Enzymexpression stark durch Fermentationsbedingungen oder Stammselektion beeinflusst werden kann. So sagt die Bezeichnung des Produktionsstammes nichts über das Aktivitätsmuster aus, die 1-3,1-4- $\beta$ -Glucanase- oder die Xylanaseaktivität kann dominieren. Enzympräparate ohne Nebenaktivitäten, wie das *A. oryzae* Produkt sind gentechnisch verändert (eine Hauptaktivität im *A. oryzae*-Zymogramm).

In den Molmassenbestimmungen der 1-3,1-4- $\beta$ -Glucanase- und Xylanaseaktivitäten zeigte das Enzympräparat *A. niger I* bis zu 10 Banden mit Aktivität auf  $\beta$ -Glucan und im Enzympräparat *H. insolens* bis zu 11 Banden mit Aktivität auf Xylan, wobei durch Vergleich der isoelektrischen

Punkte gezeigt werden konnte, daß es sich um unterschiedliche Enzyme handelt. Das Zymogramm des Enzympräparats Biofeed Wheat® (*A. oryzae*) zeigte nur sehr geringe Nebenaktivitäten im Vergleich zu Präparaten, wie z.B. *T. viride*, *H. insolens*. Diese Aktivitäten lassen sich wahrscheinlich auf Substratverunreinigungen zurückführen. Die Zymogramme von *T. viride*, *H. insolens* lassen auf Fermentationsbedingungen schließen, die auf die Ausschüttung des Enzyms der jeweiligen Hauptaktivität optimiert sind. Rohenzympräparate vom selben Stamm, z.B. die *A.-niger-I-*, *II-*, *T.-reesei-I-* und *II-*Enzympräparate zeigten einander entsprechende Aktivitäten gleicher Molmasse. Jedoch wurden auch Aktivitäten in einem Präparat entdeckt, welche in dem entsprechenden anderen Präparat fehlten. Die unterschiedlichen Aktivitätsschwerpunkte lassen ebenfalls auf veränderte Produktions/Fermentationsbedingungen schließen.

Die maximale Aktivität der NSP-hydrolysierenden Enzyme hängt sehr stark von dem optimalen pH-Wert des Enzympräparates ab. pH-Optima einzelner aktiver Komponenten eines Enzympräparates können sehr unterschiedlich sein (z.B. *H. insolens*), sie setzen sich zum pH-Profil des gesamten Enzympräparates zusammen. Sie können aber auch ein einziges Optimum haben, wie z.B. das *A. niger II*-Präparat (pH 4,5). Durch die unterschiedlichen pH-Optima der einzelnen Enzym-Komponenten wirken sie bei der Passage durch den Verdauungstrakt an unterschiedlichen Orten.

Die Temperaturstabilität der Enzympräparate ist eine wesentliche Voraussetzung zur Erhaltung der Wirkung im Verdauungstrakt, da die Futtermittel beim Pelletieren Hitze und Druck ausgesetzt sind. Sie beeinflusst die Wiederfindung enzymatischer Aktivität bei der Futtermittelanalytik. Dazu muß angemerkt werden, daß in wässrigen Medien die Temperaturstabilität wesentlich geringer ist als in Futtermitteln mit geringem Wassergehalt (7–12%). Die Temperaturstabilität der einzelnen Enzympräparate variierte stark, wobei hochmolekulare Enzymfraktionen tendenziell empfindlicher waren. Für Enzymaktivität auf Xylan konnte gezeigt werden, daß unter praktischen Pelletierbedingungen bis zu ca. 80% Aktivitätsverlust auftreten. Durch die Wahl spezieller Produktionsorganismen, bzw. die Expression ausgewählter Isoenzyme, kann die Temperaturstabilität erheblich verbessert werden (POLITZ ET AL. 1993, WELFE ET AL. 1994), z.B. durch die Verwendung der aus *T. alba* ULJB1 klonierten Xylanase (BLANCO ET AL. 1997).

Die HPLC-Chromatogramme [PULS ET AL. 1991] der enzymatischen Hydrolyseprodukte von Haferspelzenxylan durch verschiedene Enzympräparate zeigten, daß Enzympräparate nach 16–18 h Inkubation ein von der Enzymkonzentration unabhängiges, charakteristisches Hydrolysemuster liefern und somit als Endproduktanalyse gewertet werden. Das Hydrolysemuster des gentechnisch veränderten *A.-oryzae*-Stamms (Monoenzym: Einzelxylanase) und der in dieser Arbeit isolierten Xylanase aus *T. reesei I* sind nahezu identisch. Das liegt daran, daß beide Xyla-

nasen das Makromolekül Haferspelzenxylan auf die gleiche Art zerschneiden und keine anderen Xylanasen im Enzympräparat vorhanden sind, die das Molekül weiter zerteilen. In Enzympräparaten mit mehreren Xylanasen wird das Substratmolekül von mehreren Xylanasen hydrolysiert, bzw. hintereinander, falls das Enzympräparat zusätzliche exo-Xylanasen (Xylosidase) enthält, die in der Lage sind, bereits zu linearen Xylooligosacchariden hydrolysiertes Xylan weiter zu hydrolysieren. Das *H. insolens*-Präparat hydrolysiert zu kleinen Abbauprodukten, wie Xylose, Xylobiose und Xylosetrimer, aber sie liegen im Vergleich zu dem *T. viride*- und *A. niger I*-Präparat in erheblich niedriger Konzentration vor. Als pH-Optima der Xylanasen von *H. insolens* wurden pH 4,5, 5,5 und 6,5 bestimmt. Die Hydrolyseprofile wurden bei pH 5,4 aufgenommen. Vermutlich kann die bei diesem pH-Wert aktivste Enzymfraktion mit dem pH-Optimum 5,5 das Substrat in 16–18 h nicht zu vergleichbar hohen Konzentration an niedermolekularen Abbauprodukten hydrolysieren, wie die Xylanase von *T. viride* (pH 5,5) bzw. die Xylanasen von *A. niger I* (4,5, 5,5, 6,5).

Die unterschiedlichen Geradensteigungen im Agardiffusionstest von Enzympräparaten gleicher und unterschiedlicher mikrobieller Herkunft bestätigen, daß die Enzympräparate das gleiche Substrat in unterschiedlicher Geschwindigkeit zu verschiedenen Hydrolyseprodukten abbauen.

#### Substrate und Modifizierung

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität gegenüber Xylan und  $\beta$ -Glucan wurden die kommerziell erhältlichen Substrate Haferspelzenxylan und Lichenin bzw.  $\beta$ -Glucan verwendet.

Der vollständige Abbau eines verzweigten Xylans erfolgt durch mehrere Enzyme. Die endo-1,4- $\beta$ -Xylanase greift das Polysaccharid-Rückgrat an und hydrolysiert zu linearen Xylooligosacchariden. Diese werden von Xylosidasen bis zur Xylose hydrolysiert [BIELY 1985]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Bildung des Enzym-Substratkomplexes, die Rolle des Enzyms besteht darin, dem Reaktionspartner eine bestimmte Orientierung zu bieten. Dabei kommt es offenbar zu einer großen Zahl von Nebervalenzbindungen zwischen dem Substrat und dem Enzym. Von einer COOH-Gruppe des Enzyms geht ein  $H^+$  an den Glycosidsauerstoff, die Bindung wird gelöst, es bleibt ein Carbeniumion am C-1 des Ringes, welches durch eine COO<sup>-</sup>-Gruppe des Enzyms stabilisiert wird. An das Carbeniumion lagert sich H<sub>2</sub>O an und  $H^+$  wird abgespalten [KARLSON 1977].

Die Substrate wurden chemisch (Acetylierung, Carboxymethylierung, Farbstoffkopplung), biologisch (enzymatische Hydrolyse), physikalisch (Hitze, Druck, Ultraschall) modifiziert. Die Zielstellung bei der biologischen und physikalischen Behandlung war eine Verkleinerung der Molmasse. Die Carboxymethylierung sollte eine Löslichkeitsverbesserung, die Acetylierung eine

Aufweitung des intermolekularen Abstandes bewirken. Die Farbstoffe sollten als photometrisch detektierbare Gruppe in das Substrat eingeführt werden. Die Charakterisierung der modifizierten Substrate über HPLC–Hydrolysechromatogramme der verschiedenen Haferspelzenxylanmodifikationen zeigte, daß das ultraschallbehandelte Haferspelzenxylan zu Endprodukten kleiner Molmassen abgebaut wird, während das unbehandelte und das autoklavierte noch Produkte hoher Molmassen enthält. Die Chromatogramme der Hydrolyseprodukte des unbehandelten und des autoklavierten Haferspelzenxylans sind identisch. Die NMR–Aufnahme zeigt, daß unbehandeltes Xylan mehr chemisch gebundenes Wasser als autoklaviertes und ultraschallbehandeltes enthält. Der Anteil des freien Wassers ist beim ultraschallbehandelten und beim autoklavierten Haferspelzenxylan größer. Diese Unterschiede waren erst nach Fällung mit Isopropanol und anschließender Trocknung zu erkennen. Nach Ethanol-fällung und anschließender Trocknung waren keine Unterschiede erkennbar. Isopropanol ist ein größeres und „sperrigeres“ Molekül als das „lineare“ Ethanol, d.h. die inter- und intramolekularen Lücken im Haferspelzenxylan sind nach Verdampfen des Isopropanols größer. Es können mehr Wassermoleküle eingelagert werden, bzw. durch den großen Abstand werden intermolekulare Wasserstoffbrücken verhindert. Autoklavierung bewirkt also keine Verkleinerung der Molmasse sondern eine Aufweitung der intermolekularen Abstände. Eine irreversible Verkleinerung wurde nur durch die Ultraschallbehandlung erreicht. Dafür spricht, daß ultraschallbehandeltes Haferspelzenxylan mit Kongorot nicht aus wässrigem Medium ausgefällt werden kann wie autoklaviertes bzw. unbehandeltes Xylan. Auch steigt die Konzentration des gelösten Haferspelzenxylans und die Viskosität der Lösung mit der Dauer der Ultraschallbehandlung. Das Substrat wird über die Dauer der Ultraschallbehandlung besser löslich. Ultraschallbehandeltes Xylan bietet dem Enzym mehr Möglichkeiten zur Anlagerung. Das autoklavierte bietet weniger, aber immer noch mehr Anlagerungsmöglichkeiten als das unbehandelte Xylan. Die Anzahl der reduzierenden Gruppen des Substratmoleküls bleibt bei beiden Modifikationen im Vergleich zum unbehandelten Xylan unverändert. Je mehr Enzym–Substratkomplexe gebildet werden können, desto schneller erfolgt der Abbau. Das wird durch die Ergebnisse des Agardiffusionstests bestätigt. Die Lysezonen, die mit ultraschallbehandelten als Substrat entstehen, sind klarer abgegrenzt (heller) und größer als die Lysezonen, die mit unbehandeltem bzw. autoklaviertem Substrat in der gleichen Zeit entstehen, der Abbau des Substrats ist schneller und vollständiger. Die Herstellung des Ultraschallxylans beeinflusst die Substratqualität wesentlich. Wird es mit Ethanol ausgefällt, getrocknet und zur Enzymbestimmung wieder gelöst, so ist die Verbesserung z.B. im Agardiffusionstest gegenüber dem unbehandelten Xylan minimal. Deutlich ist die Verbesserung, wenn es direkt aus der Lösung eingesetzt wird. Daraus folgt, daß sich durch die Fällung und anschließende Trocknung sehr stabile inter- bzw. intramolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden, welche die Angriffsfläche für das Enzym minimieren.

Die chemische Modifizierung der Substrate durch Einführung funktioneller Gruppen war für die Enzymaktivitätsbestimmung ungeeignet. Die Carboxymethylierung wurde zur Löslichkeitsverbesserung des Substrats und die Acetylierung zur Vergrößerung des intermolekularen Raums im polymeren Substrat eingesetzt. Das Chromatogramm des dicarboxymethylierte Haferpelzenxylans zeigt ein nicht aufgelöstes Maximum höherer Molmasse, d.h. die Teile des Substrats, die dicarboxymethyliert sind, werden von dem aktiven Zentrum des Enzyms nicht erkannt. Dafür spricht auch, daß das dicarboxymethylierte Substrat im Vergleich zum unbehandelten nur 10% und das monocarboxymethylierte nur 40% der Reaktivität im DNSS-Test hat. Das maximalcarboxymethylierte Haferpelzenxylan reagiert gar nicht mit dem DNSS-Reagenz. Dies ist vermutlich auf die Blockierung der reduzierenden Gruppen des Substrates und die Ausbildung sehr stabiler Wasserstoffbrücken durch die in das Substrat eingeführte COOH-Gruppe, die den Glycosidsauerstoff des Substrates durch Protonierung für das H<sup>+</sup> aus dem Enzym blockiert, zurückzuführen sein. Eine andere Möglichkeit ist, daß das bei dem für Enzymreaktionen verwendeten pH-Wert das Proton der COOH-Gruppe abdissoziiert und durch diese negative Ladung (COO<sup>-</sup>) Protonen aus dem Enzym abfängt. Weitere Gründe zur Hemmung der Enzymreaktion sind die unter den ziemlich drastischen Reaktionsbedingungen der Carboxymethylierung durch Zerstörung des Haferspelzenxylans entstehenden Reaktionsnebenprodukte, die mit dem Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms konkurrieren (kompetitive Hemmung) oder an einem anderen Ort des Enzymmoleküls gebunden werden und dadurch die Konformation des Enzyms ändern, was wiederum die Bindung des Substrats am aktiven Zentrum erschwert (allosterische Hemmung).

Die biologische Modifikation über eine Teilhydrolyse des Substrats führte zu keiner Verbesserung. Diese Modifikation hatte eine Verkleinerung des hochpolymeren Substrats und damit eine für das Enzym erleichterte Zugänglichkeit zum Ziel. Das Substrat war vermutlich schon soweit hydrolysiert, daß es für die Xylanase kein Substrat mehr darstellt, im Agardiffusionstest haben die Lysezonen einen schlechteren Kontrast. Die Molmasse des Substrates ist sowohl innerhalb, als auch außerhalb der Lysezonen schon soweit verkleinert, so daß Kongorot schlecht bindet. Eine Normierung durch anschließende Filtration und Auftrennung nach Molekülgröße [LATTOVA ET AL. 1992] erwies sich als nicht durchführbar, da nur zwei Fraktionen, eine hochmolekulare und eine niedrigmolekulare isoliert werden konnten. Dies lag vermutlich daran, daß der optimale Punkt der höchsten Konzentration an gerade noch beispielsweise mit Kongorot reagierendem Substrat nicht zu detektieren war. Eine Auftrennung des Hydrolysates über die FPLC war wegen der fehlenden Detektionsmöglichkeit des hydrolysierten Produktes schwierig. Die Ausbeute der verschiedenen aufgetrennten und aufkonzentrierten Molmassen war für enzymati-

sche Tests zu gering. Die Filtration der teilhydrolysierten Substrate führte deshalb zu keinem Fortschritt für die Enzymbestimmung.

#### Methoden:

Agardiffusionstest: Nach Inkubation enzymhaltiger Lösung in den Löchern einer substrathaltigen Agarplatte (Xylan,  $\beta$ -Glucan) färbt Kongorot nur Bereiche mit hochmolekularem Substrat an, enzymatisch hydrolysiertes Substrat ist durch helle Zonen zu erkennen. Im Vergleich zu den publizierten Methoden, wo die Substrate durch Kochen präpariert wurden [EDNEY ET AL. 1986, WALSH ET AL. 1995] und den anderen Behandlungsmethoden (Tempern, Carboxymethylieren, Acetylieren, enzymatische Behandlung), erwiesen sich zwei Möglichkeiten, die schnell und einfach durchgeführt werden können, als geeignet: die Autoklav- und die Ultraschallbehandlung. Die Verwendung von ultraschallbehandelten Substraten (Haferspelzenxylan,  $\beta$ -Glucan) führte zu einer verbesserten Nachweisempfindlichkeit, da auch sehr kleine Lysezonen ( $< 10 \text{ mm}^2$ ) auswertbar wurden. Der Meßbereich wird vergrößert. Autoklaviertes Haferspelzenxylan als Substrat brachte nicht in allen Medien eine Verbesserung. Dieses liegt vermutlich daran, daß das hochpolymere Substratmolekül für das Enzym schlechter zugänglich ist und deshalb nach der Inkubation immer noch hochmolekulare Substrate vorliegen, die von Kongorot angefärbt werden. Ultraschallbehandeltes Substrat wird vermutlich schneller und vollständiger hydrolysiert, wie durch die deutlicher abgegrenzten (helleren) Lysezonen erkennbar ist. Der Agardiffusionstest bestätigt auch die oben geäußerte Vermutung, daß die Angriffsfläche für das Molekül bei ethanolischgefälltem Ultraschallxylan kleiner ist, da mit diesem als Substrat kleinere Lysezonen entstehen, als mit ungefällten. D.h. die Bildung des Enzym-Substratkomplexes ist langsamer. Die Nachweisgenauigkeit wurde auch durch Verwendung von photometrischer Software, welche die relativ unempfindliche Auswertung des Lysezonedurchmessers mittels Lineal durch eine digitale Auswertung der Lysezonenflächen ersetzt, verbessert.

Viskositätsabnahme: Die Enzymaktivitätsbestimmung mit den Substraten wie 2%ige Haferspelzenxylan-, 5%ige autoklavierte Haferspelzenxylan-, 5%ige Carboxymethylxylan- [MCCLEARY 1982], 1%ige Gersten  $\beta$ -Glucan, 2%ige Licheninlösung oder Xylanschwefelsäureester [HUSEMANN ET AL. 1950] wurde durch niedrige Viskositäten, die vermutlich an einer zu guten Löslichkeit durch die Einführung der Carboxymethylgruppen lag und eine hohe Standardabweichung, sogar in Parallelproben, beeinflusst. Nach Enzymzugabe stieg die Viskosität an, weil das Enzym partiell das polymere Substrat hydrolysiert, welches durch diesen Vorgang löslich wird und die Viskosität der Lösung erhöht. Bei den bisherigen Viskositätsmessungen mußte in einer Zweipunktmessung die Anfangsviskosität der Probe von der Endviskosität nach der Inkubation abgezogen werden, da wegen der langsamen Einstellung des Lösungsgleichgewichts des Substrats

die Viskosität innerhalb der ersten 5 min stark schwankt. Diese Effekte heben die Detektionsgrenze an und niedrige Enzymkonzentrationen können die Viskosität nicht unter den Anfangswert absenken. Ultraschallbehandelte Substrate zeigten diesen Anstieg nicht. Vermutlich ist die Molmasse des Haferspelzenxylans schon soweit verkleinert, daß es durch enzymatische Hydrolyse von polymeren Substrat keine weitere Löslichkeitsverbesserung gibt. Außerdem waren die Viskositätswerte sehr gut reproduzierbar. Beides ermöglichte es die Viskositätsabnahme durch Enzymaktivität mit einer Endmessung zu bestimmen. Eine Inkubationszeit von 1 h verbesserte die Detektionsgrenze zu kleineren Enzymkonzentration im Vergleich zur Inkubationszeit von 0,5 h. Das Enzym hat mehr Zeit das Substrat zu kleinerer Molmasse zu hydrolysieren. Dadurch ist die Viskositätsveränderung besser meßbar. Da eine Verlängerung auf 3 h keine signifikante Verbesserung mehr brachte, ist das Substrat vermutlich bereits soweit hydrolysiert, daß die Viskositätsänderung nicht mehr meßbar ist.

Chromogene Substrate: Chromogene Substrate sind Xylane oder  $\beta$ -Glucane, die einen Farbstoff kovalent oder ionisch gebunden haben. Enzymatische Hydrolyse setzt den ionisch gebundenen Farbstoff bzw. niedermolekulare Hydrolyseprodukte mit gebundenem Farbstoff frei. Die Absorptionsdifferenz zwischen hydrolysiertem und nicht hydrolysiertem Substrat entspricht der Enzymaktivität. Die Enzymaktivitätsbestimmung wurde über kommerzielle Substrate (Azo-arabinoxylan aus Weizen und Azo- $\beta$ -Glucan [MCCLEARY 1995]) in Tabletten und in flüssiger Form und mit in dieser Arbeit hergestellten Substraten (mit anionisch-, kationisch-, kovalentgebundenen Farbstoffen) durchgeführt.

Der Versuch, chromogenes Substrat aus enzymatisch teilhydrolysiertem Haferspelzenxylan und ionischen Farbstoffen herzustellen, zeigte, daß ionische Farbstoffe an diesem Substrat sehr schlecht binden. Dies liegt vermutlich an der Molekülgröße des Substrats, wie auch aus der Kongorotanfärbung von hochmolekularem Substrat im Agardiffusionstest zu erkennen ist. Daraus läßt sich schließen, daß die Bindung der ionischen Farbstoffe an das Haferspelzenxylan durch Einschluß des Farbmoleküls in das Haferspelzenxylanmakromolekül stabilisiert wird.

Die Enzymbestimmung im Futtermittel unterlag vielfältigen Problemen, z.B. hydrolysiert das Enzym Pentosane des Futtermittels, wie mit der durch die Verwendung von Futtermittel A als Substrat im Agardiffusionstest gezeigt werden konnte. Die Pentosane des Futtermittels sind nicht mit gekoppeltem Farbstoff bzw. COOH-Gruppen blockiert und konkurrieren deshalb mit dem unsubstituierten Teil des Testsubsubstrats um das aktive Zentrum des Enzyms. Außerdem kann die Anlagerung des modifizierten Substrats zu den oben beschriebenen Hemmungen führen.

Die Enzymaktivitätsbestimmungen über chromogene Substrate mit anionischen Farbstoffen [WOOD 1982, 1985] sind durch die notwendige Zeitverlaufsmessung sehr umständlich, da ein Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Ethanol nicht möglich ist. Zur Enzymaktivitätsbestimmung im Futtermittel eignen sie sich nicht. Vermutlich stellt sich ein Lösungsgleichgewicht zwischen ionisch an das Substrat gebundenem und an Futtermittelkomponenten gebundenem und gelöstem Farbstoff ein, welches durch die Ethanolzugabe gestört wird.

Chromogene Substrate mit dem Kation Rutheniumrot [RESCIGNO ET AL. 1994] eignen sich für die Bestimmung von Enzymaktivität im Puffer, aber im Futtermittlextrakt wurden negative Extinktionen erhalten. Das läßt auf Nebenreaktionen des freigesetzten Kations mit Futtermittelkomponenten schließen.

Zur Enzymaktivitätsbestimmung in Futtermittlextrakten war Xylan mit kovalent gebundenem Remazolbrilliant Blue [BIELY 1985] und anderen Reaktivfarbstoffen nicht gut geeignet, da zu niedrige Absorptionen vorlagen. Vermutlich liegen wieder Nebenreaktionen vor in denen freigesetzter Farbstoff bzw. Hydrolyseprodukte mit Farbstoff mit Komponenten aus der Futtermittel/Substratmischung, z.B. mit Polysacchariden aus dem Futtermittel, bzw. mit dem nicht hydrolysiertem Substrat reagieren. Das konnte in Versuchen mit freiem RBB gezeigt wurde. Diese Nebenreaktionen treten offenbar besonders dann auf, wenn die Farbstoffe noch über freie reaktive Gruppen verfügen, z.B. kann das RBB mit der  $\text{SO}_3^-$ -Gruppe zusätzlich ionisch an das Substrat koppeln. Enzymbestimmung mit chromogenen Substraten im Futtermittel ist mit der Farbstoffkomponente Azurin B ist, wie sie in den kommerziellen Substraten der Fa. Megazyme [MC-CLEARY 1995] unter anderem mit carboxymethyliertem Xylan verwendet wird. Azurin B hat außer der einen reaktiven Gruppe, die bei der Kopplungsreaktion als Abgangsgruppe verwendet wird, keine weitere freie reaktive Gruppe. Im Vergleich mit dem kommerziellen Präparat erwies sich dieses wegen der bereits optimierten Fertigungsbedingungen verständlicherweise als besser.

Farbreaktion: Die negativen Extinktionen, die gegenüber dem Blindwert bei der Enzymbestimmung mittels chromogener Substrate mit gekoppelten Reaktivfarbstoffen im Futtermittel auftraten, führten zu der Entwicklung der Farbreaktion. Diese basiert auf der Differenzmessung zwischen gebundenem und ungebundenem Farbstoff. Das Enzym hydrolysiert Polysaccharide des Futtermittels bzw. des Substrats. Unhydrolysierte Polysaccharide des Futtermittels bzw. Haferspелzenxylanpolymere reagieren mit Remazol Brilliant Blue. Hydrolyseprodukte reagieren am besten mit Reaktivgrün. Der Grund dafür liegt vermutlich an der Struktur des Farbstoffs. Es ist ein großes flexibles Molekül und verfügt über 6  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen, welche ein kleines Hydroly-

seprodukt (Xylose, Xylobiose, etc.) im Vergleich zu Kongorot mit seinen 2  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen gut chelatisieren kann.

Da die Extinktionsdifferenz zwischen hydrolysiertem und unhydrolysiertem Haferspelzenxylan nach der Reaktion mit Reaktivgrün größer war, wurde die Farbreaktion mit dem Farbstoff Reaktivgrün entwickelt. Je mehr Enzym zugesetzt wird, desto mehr niedermolekulare Hydrolyseprodukte entstehen. Die Extinktion wird negativer, da mehr Farbstoff bezogen auf die Referenzlösung mit den Hydrolyseendprodukten reagiert. Nach 160 h Hydrolyse lagen alle Extinktionswerte bei ca. -0.7. Es entstehen keine Produkte mehr, die mit Reaktivgrün umsetzbar sind, weil alle für das Enzym verwertbaren Substrate verbraucht sind. Mit der Farbreaktionsmethode können bis zu 0,05 IE/ml im Futtermittelextrakt bestimmt werden. Die Detektionsgrenze im Futtermittelextrakt ist genauso empfindlich wie die der kommerziellen chromogenen Substrate, aber der Meßbereich ist kleiner.

Der Arbeitsaufwand der Bestimmungsmethoden kann wie folgt zusammengestellt werden:

Agardiffusion < chromogene Substrate = Farbreaktion < Viskosimetrie. Der Nachteil der Viskosimetrie ist die Reinigung der Meßapparatur nach jeder Messung, dies kann jedoch durch Verwendung eines automatisiertem Fallviskosimeters, wie es der Enzymhersteller Gist-Brocades (Niederlande) benutzt verbessert werden. Der Agardiffusionstest ist als einfache Methode bewährt und die Bestimmung mittels kommerzieller Präparate in Tablettenform hat den Vorteil einer sensitiven Detektion mittels variabler Inkubationszeiten (10 min–2 h). Das ist beim Agardiffusionstest auch möglich, aber unpraktikabel (Verlängerung von 24 h auf 72h).

Enzymbestimmung im komplexen Medium und Anwendung der modifizierten Substrate:

In den in der Literatur beschriebenen Fütterungsversuchen werden die Enzyme zugegeben, aber die Wiederfindung im Futtermittel wird oft nicht weiter geprüft [PAN ET AL. 1998]. WALSH ET AL. [1995] verwendet den Agardiffusionstest zur Detektion von Enzym im Futtermittel, FUENTE ET AL. [1998] und ESTEVE-GARCIA [1997] bestimmen die Enzymaktivität über kommerzielles chromogenes Substrat [MEGAZYME, IRLAND]. Über Viskositätssenkung wird die Enzymzugabe zum Futtermittel von PACK UND BEDFORD [1998] bestimmt. Für die Produktinformationen der Vertreiber [LOHMANN 1994] und der Hersteller [ROCHE 1998] werden die Enzymaktivitäten ebenfalls über kommerzielle chromogene Substrate [MEGAZYME, IRLAND] bestimmt.

Futtermittel werden oft unter Hitze und Druck pelletiert. Die Bestimmung der Temperaturstabilität zeigte bei den in dieser Arbeit untersuchten Enzympräparaten Aktivitätsverluste bis zu 80%. Zur Aktivitätsbestimmung müssen die Enzyme aus Futtermittel extrahiert (1:5). Die Extraktion des Enzympräparates hängt von der Art des Enzyms ab, z.B. wenn es, wie alle bisher

bekannten Xylanasen ein cellulosebindendes Zentrum („cellulose-binding domain“) hat, kann es nicht vollständig aus dem Futtermittel extrahiert werden [TOMME ET AL. 1994 U. 1995, HALL ET AL. 1995, MARGOLLES-CLARK 1996, GARDA ET AL. 1997]. Die Extraktion erfolgt in Puffer (in dieser Arbeit wurde Natriumacetatpuffer pH 6,0; Futtermittel im Verhältnis 1:5 verwendet). Dieser Puffer hat nicht den optimalen pH-Wert für die Aktivitätsbestimmung aller Präparate, seine Pufferwirkung ist für Hydroxidionen ab pH 5,5 begrenzt, er wurde verwendet, da pH 6 den physiologischen Bedingungen unter denen Futtermittelenzyme eingesetzt werden am nächsten ist. In der Literatur sind Enzymeinmischungen von 0,05 (Roxazyme® [JEROCH UND MÜLLER 1993] bis 8 g/kg (Energex®, LOHMANN 1994] angegeben. In Tabelle 50 sind Beispiele der Restaktivitäten einiger Enzymeinmischungen, wie sie in Fütterungsversuchen verwendet wurden, aufgeführt. Als Basis für die Berechnung diente eine angenommen Restaktivität nach der Pelletierung von 50%, die in dieser Arbeit bestimmte Aktivität auf  $\beta$ -Glucan und Xylan und eine vorausgesetzte 100%ige Extraktion. Mit den in dieser Arbeit untersuchten und weiterentwickelten Methoden lassen sich die  $\beta$ -Glucanaktivitäten der Enzyme: Biofeed plus®, Biofeed Wheat®, Bio-pract®, Energex® und Roxazyme® mittels des Agardiffusionstests und der Viskositätssenkung mit ultraschallbehandelten  $\beta$ -Glucan als Substrat bestimmen. Die Xylanaseaktivität ist bei allen aufgeführten Präparaten mit den Methoden Agardiffusionstest, Viskosität, Farbreaktion und den kommerziellen chromogenen Substraten (Megazyme, Irland) bei pH 6 bestimmbar. Allerdings wird mit allen Methoden am unteren Meßbereich gemessen, so daß jeder weitere Einfluß die Bestimmungsgrenze verschlechtert. Es wurden die in dieser Arbeit mittels DNSS-Test bestimmten Enzymaktivitäten vorausgesetzt. Diese müssen nicht den Aktivitäten der in den Fütterungsversuchen verwendeten Enzymchargen entsprechen. Durch die oben erwähnte Cellulose-binding-domain der Xylanasen können sie nicht 100%ig extrahiert werden. Es kommen die individuellen Einflüsse verschiedener Futtermittelmischungen und Getreide hinzu. Die getreideeigenen Enzyme können die Enzymaktivität verfälschen oder die Inhibitoren, welche die Getreide am Keimen hindern, behindern auch die Aktivität der zugesetzten Enzyme. Auch die Zusammensetzungen der verschiedenen Futtermittel beeinflussen die Enzymaktivitätsbestimmungen. Die Aktivitätsbestimmung auf Xylan mittels chromogener Substrate wird in Futtermitteln auf Triticale-basis wenig, aber in Futtermittel G (Hauptbestandteile Mais, Weizen, Sojaschrot) stark beeinflusst. Vermutlich wird das aktive Zentrum des Enzyms durch Komponenten im Futtermittel G stärker beeinflusst.

Weitere Schwierigkeiten treten auf, wenn zu dem entsprechenden Futtermittel die Blindprobe ohne Enzym fehlt. Zur Aktivitätsbestimmung muß dann die Blindprobe durch Inaktivierung, was zu einer Veränderung der Matrix führt oder mit „Spiking“ gearbeitet werden. Die Bestimmung wird durch die individuellen Eigenschaften der verschiedenen Enzympräparate zusätzlich

erschwert. Da die Enzympräparate jeweils unterschiedliche Hydrolyseprodukte liefern, werden dadurch Enzymaktivitätsbestimmungen, die immer auf einer Analyse der Hydrolyseprodukte basieren, beeinflusst. Enzympräparate, die innerhalb der Inkubationszeit mehr (niedermolekulare) Hydrolyseendprodukte erzeugen, verfälschen die Enzymaktivitätsbestimmung über Viskositätsabsenkung, da durch Hydrolyse verschieden große Molmassen in unterschiedlichen Konzentrationen entstehen. Die Enzymaktivitätsbestimmung mittels chromogener Substrate wird durch die unterschiedlichen Hydrolysemuster beeinflusst, da diese Bestimmung auf der Differenzabsorptionsmessung zwischen in 66%igem Ethanol löslichen und unlöslichen farbstoffsubstituierten Hydrolyseendprodukten bzw. zwischen (ionisch) gebundenem und gelöstem ionischen Farbstoff beruht. Im Agardiffusionstest zeigten die Enzympräparate ihr unterschiedliches Reaktionsverhalten auf die Substrate durch verschiedene Steigungen der Geraden. Deshalb muß jede Bestimmungsmethode auf das jeweilige Enzympräparat kalibriert werden und hat seine individuellen Detektionsgrenzen.

Die einzelnen Getreide- und Futtermittelextrakte wiesen bei allen untersuchten Präparaten den gleichen inhibierenden Effekt auf die Enzymaktivitätsbestimmung mittels Agardiffusionstest auf Basis der Substrate Lichenin und Xylan auf. Das deutet daraufhin, daß die Inhibition oder Inaktivierung der Enzyme von der Art des Getreides und nicht vom Enzym selbst abhängt. Zusätzlich wurde festgestellt, daß Enzympräparate Pentosane in Futtermittelextrakten (z.B. Futtermittel A auf Weizenbasis) genau wie Haferspelzenxylan hydrolysieren. Dadurch wird weniger Testsubstrat abgebaut, dieses muß ebenfalls durch eine Kalibrationskurve ausgeglichen werden. In Digestaprobe ist die Enzymbestimmung noch zusätzlich durch den pH-Wert der Digestaflüssigkeit, die oft nicht dem Optimum des Enzympräparates, bzw. einer Komponente des Präparates entspricht, erschwert. Zusätzlich wird das Futterzusatzenzym durch Proteaseaktivität hydrolysiert und dadurch unterbestimmt.

### Bilanz der Ergebnisse und Ausblick

Charakterisierung der Futterzusatzenzyme: Die Enzympräparate wurden charakterisiert, dazu wurde die Substratspezifität, die Thermostabilität bestimmt und die pH-Optima mittels DNSS-Test ermittelt. Xylanase betonte Präparate sind Avizyme<sup>®</sup>, Biofeed plus<sup>®</sup>, Biofeed Wheat<sup>®</sup>, Lyxasan<sup>®</sup>, Hostazym X<sup>®</sup>, Novozyme 104<sup>®</sup> und Roxazyme<sup>®</sup>, 1-3,1-4-β-Glucanase betonte sind Barlican<sup>®</sup>, Biopract<sup>®</sup> und Energex<sup>®</sup>. Fast alle Enzympräparate bestehen aus einem Gemisch unterschiedlicher Enzyme, die sich im isoelektrischen Punkt, pH-Optimum etc. unterscheiden, mit mindestens zwei Xylanase-Aktivitäten. Die Ausnahme ist Biofeed Wheat<sup>®</sup> (*A. oryzae*), welches nur ein Enzym mit Xylanaseaktivität enthält. Die Analyse der Hydrolyseprodukte der unterschiedlichen Enzympräparate zeigte für jedes Enzympräparat eine enzymkonzentri-

onsunabhängige Produktverteilung. Die unterschiedliche Verteilung der Abbauprodukte beeinflusst Enzymaktivitätsbestimmungen, die auf Hydrolyseproduktbestimmung beruhen.

Die Hydrolysemuster der einzelnen Xylanasen aus einem Enzympräparat können in weiterführenden Arbeiten bei den jeweiligen pH-Optima aufgenommen werden, um festzustellen, zu welchen Produkten sie hydrolysieren. Damit können Aussagen gemacht werden, an welchen Wirkungsorten im Darmtrakt bestimmte Hydrolyseprodukte entstehen.

Entwicklung von Testsubstraten: Ein gut lösliches Substrat konnte mit dem ultraschallbehandelten Haferspelzenxylan entwickelt werden. Das Problem der Abhängigkeit der Detektionsgrenze von der Substratcharge konnte nicht gelöst werden, aber der Einfluß wurde durch die Ultraschallbehandlung verkleinert, da eine Aufweitung des Meßbereichs erreicht wurde. Die Einführung funktioneller Gruppen und Kombination mit Farbstoffen zu chromogenen Substraten brachte gegenüber den kommerziellen chromogenen Substraten keinen Vorteil. Eine Normierung des chemisch bzw. enzymatisch partiell hydrolysierten oder physikalisch zerkleinerten Substrats durch Filtration scheiterte, weil sich aus der chemischen Hydrolyse keine für enzymatische Reaktionen brauchbare Produkte isolieren ließen. Die Normierung durch Filtration funktionierte nicht, da zum einen immer praktisch nur zwei Fraktionen, eine hochmolekulare und eine niedrigmolekulare vorlagen, zum anderen erwies sich die Auftrennung des Hydrolysates als sehr langwierig, wegen der fehlenden Detektionsmöglichkeit an der FPLC als schwierig und die Ausbeute der verschiedenen Molekülgrößen war für enzymatische Tests zu gering. In weiterführenden Arbeiten kann das Problem der Auftrennung des Hydrolysates mittels einer präparativ eingesetzte Ionenchromatographie mit amperometrischer Detektion gelöst werden. Es können dann mit definierten (Einzel-)Enzymen Xylooligomere hergestellt, aufgetrennt und die aufgetrennten Fraktionen als Substrat in verschiedenen Enzymbestimmungsmethoden verwendet werden.

Die Enzymaktivitätsbestimmung mittels Farbreaktion kann durch Verfeinern der Reaktionsbedingungen weiter optimiert werden. Sie sollte auf die Enzymbestimmung in Digestapoben angewendet werden. Die Technik der Farbreaktion kann auf die Enzymaktivitätsbestimmung von 1-3,1-4- $\beta$ -Glucanasen ausgedehnt werden. Außerdem sollte geprüft werden, ob sich der Farbstoff Reaktivgrün für den Agardiffusionstest einsetzen läßt.

## 7. Zusammenfassung

Die in der Tierernährung zur besseren Verwertung pflanzlicher Futtermittel durch landwirtschaftliche Nutztiere verwendeten Futterzusatzenzyme (Xylanasen und 1–3,1–4- $\beta$ -Glucanasen) unterliegen den gleichen analytischen Anforderungen wie andere Futterzusatzstoffe. Enzyme sind keine Substanzen mit definiertem chemischen Verhalten wie Salze oder Vitamine. Trotz gleicher Wirkungsweise unterscheiden sie sich erheblich in ihren biochemischen Eigenschaften. Aktivitäten NSP-spaltender Enzyme können nur indirekt über die Wirkung auf ein spezifisches Substrat bestimmt werden. Nachweisempfindlichkeit und Meßbereich schwanken jedoch wegen der verschiedenen Eigenschaften natürlicher Substrate und den biochemischen Charakteristika der Enzyme.

Die Enzympräparate wurden charakterisiert, indem pH-Optimum, isoelektrischer Punkt, Anzahl der aktiven Enzyme innerhalb und die Verteilung der enzymatischen Abbauprodukte eines Enzympräparates bestimmt wurden. Substrate wurden zur Empfindlichkeitssteigerung physikalisch, chemisch und biologisch modifiziert und in den Methoden Agardiffusionstest, Viskositätsabnahme, chromogene Substrate und Farbreaktion zur Bestimmung enzymatischer Aktivität in komplexen Proben wie Futtermittelmischungen und Digesta eingesetzt.

Die kommerziellen Enzympräparate Avizyme 1300<sup>®</sup> (*Trichoderma longibrachiatum*, *T. viride*), Biofeed plus<sup>®</sup> (*Humicola insolens*), Biofeed Wheat<sup>®</sup> (*Aspergillus oryzae*), Lyxasan<sup>®</sup> (*A. niger* I), Roxazyme<sup>®</sup> (*T. viride*), Barlican<sup>®</sup> (*T. reesei* I), Biopract<sup>®</sup> (*T. reesei* II), Energex<sup>®</sup> (*A. niger* II), Novozyme 104<sup>®</sup> (*k.a.*), und Hostazym X<sup>®</sup> (*k.a.*) wurden in der hier vorliegenden Arbeit aufgereinigt, die Aktivitäten und Substratspezifitäten auf Xylan, Laminarin, Carboxymethylxylan (CMC) und  $\beta$ -Glucan bestimmt und nach ihren Hauptaktivitäten in xylanase- und  $\beta$ -glucanasebetonte Präparate eingeteilt. Fast alle Enzympräparate bestehen aus einem Gemisch unterschiedlicher Enzyme, die sich im isoelektrischen Punkt, pH-Optimum, etc. unterscheiden, mit mindestens zwei Xylanaseaktivitäten. Die Ausnahme ist Biofeed Wheat<sup>®</sup> (*A. oryzae*), welches nur ein Enzym mit Xylanaseaktivität enthält, kloniert aus *Thermomyces lanuginosus*. Der Vergleich der beiden *A.-niger*-Präparate und der *T.-reesei*-Präparate läßt ebenfalls darauf schließen, daß Fermentationsbedingungen oder Stammauswahl durch Selektion verändert wurden. Die Analyse der Hydrolyseprodukte der unterschiedlichen Enzympräparate zeigte für jedes Enzympräparat eine von den Enzymkonzentrationen unabhängige Produktverteilung. Die unterschiedliche Verteilung der Abbauprodukte beeinflusst Enzymaktivitätsbestimmungen, die auf Hydrolyseproduktbestimmung beruhen. Dieses wird durch unterschiedliche Steigungen in den Kalibrationsgeraden der Enzympräparate gezeigt. Es muß also für jedes Enzympräparat eine eigene Kalibrationsreihe aufgenommen werden.

Der DNSS-Test (reduzierende-Zucker-Methode) wurde benutzt, um die eingesetzte Enzymmenge in den Enzymaktivitätsbestimmungsmethoden miteinander vergleichbar zu machen. Dieser Test ist nur in Puffer, nicht in Futtermittelextrakten o.ä. Lösungen mit reduzierenden Substanzen anwendbar, da diese die 3,5-Dinitrosalicylsäure ebenfalls reduzieren.

Chromogene Substrate: Chromogene Substrate sind Xylane oder  $\beta$ -Glucane, die einen Farbstoff kovalent oder ionisch gebunden haben. Die enzymatische Hydrolyse setzt den ionisch gebundenen Farbstoff bzw. niedermolekulare Hydrolyseprodukte mit kovalent gebundenem Farbstoff frei. Die Absorptionsdifferenz zwischen hydrolysiertem und nicht hydrolysiertem Substrat entspricht der Enzymaktivität. Es wurden verschiedene Farbstoffe (kovalent, anionisch, kationisch gebunden) mit unterschiedlichen Substraten (ultraschallbehandelt, carboxymethyliert, autoklaviert) zu chromogenen Substraten kombiniert und in Enzymaktivitätsbestimmungen getestet. Diese Präparate hatten jedoch gegenüber den kommerziellen Präparaten keinen Vorteil.

Enzymbestimmung über Viskositätssenkung: Die Enzymaktivitätsbestimmung beruht auf der Absenkung der Viskosität durch enzymatische Hydrolyse. Die Substrate sind chemisch oder physikalisch modifiziertes Haferspelzenxylan oder natürlicher Herkunft, wie z.B. Arabinoxylane und  $\beta$ -Glucane. Mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan ist Enzymaktivitätsbestimmung von Xylanasen im Rotationsviskosimeter in kleinen Volumina (0,5 ml) per Viskositätssenkung ohne die Messung der Anfangsviskosität möglich geworden, da das anfängliche Ansteigen der Viskosität nach der Enzymzugabe entfällt und eine genügend große Viskositätsdifferenz nach der Inkubation vorliegt.

Agardiffusionstest: Nach Inkubation enzymhaltiger Lösung in den Löchern einer substrathaltigen Agarplatte (Xylan,  $\beta$ -Glucan) wird diese mit Kongorot angefärbt. Kongorot färbt nur Bereiche mit hochmolekularem Substrat an, enzymatisch hydrolysiertes Substrat ist durch helle, runde Lysezonen zu erkennen. Meßbereich und Detektionsempfindlichkeit des Agardiffusionstests konnte durch Verwendung modifizierter Substrate (Ultraschall- und Autoklavbehandlung) und den Einsatz eines Photodokumentationssystems anstelle der Auswertung mittels Lineal verbessert werden. Durch Verwendung von ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan wurden bei allen Enzympräparat-Matrix-Kombinationen hellere und größere Lysezonen und damit besser auswertbare Ergebnisse als mit unbehandeltem und autoklaviertem Haferspelzenxylan erhalten, da aufgrund vollständiger Hydrolyse kein mit Kongorot anfärbbarer hochmolekularer Rest bleibt.

Farbreaktion: Als neue Methode zur Bestimmung auf Xylanaseaktivität wurde eine Farbreaktion entwickelt, die auf der Reaktion der Hydrolyseprodukte von ultraschallbehandeltem (lösli-

chem) Haferspelzenxylan mit dem Farbstoff Reaktivgrün basiert. Hydrolysiertes Haferspelzenxylan reagiert besser mit Reaktivgrün als nicht hydrolysiertes Substrat. Die Extinktionsdifferenz zwischen enzymatisch umgesetzten und nicht umgesetzten Haferspelzenxylan ist die Aktivität. In Natriumacetatpuffer konnten Enzymaktivitäten bis herunter zu 0,005 IE/ml, in Futtermittlextrakt bis 0,05 IE/ml bestimmt werden.

## 8. Abstract

Feed additive enzymes are used in animal nutrition for better utilization of animal diets. As all other feed additives, xylanase and/or (1–3,1–4)– $\beta$ –glucanase enzymes must be detectable in animal feed. Enzymes are not substances with defined chemical properties such as salts or vitamins. In spite of the same description of enzymes their biochemical properties are quite different. The activity of non starch polysaccharide (NSP) degrading enzymes can be detected by hydrolysis of specific substrates. The detection limit and –range depend on substrate characteristics and the biochemical characteristics of active enzymes.

Such biochemical properties were explored in the present study, i.e. the isoelectric point, substrate specificity, pH behaviour, number of active enzymes and the distribution of the hydrolytic products of the NSP hydrolysing enzyme preparations. To increase the detection limit substrates were physically, chemically and biologically modified and tested using the methods agar diffusion assay, chromogenic substrates and viscosity measurements to detect enzymatic activity in complex media such as feed mixtures and digesta extracts.

The commercial enzyme preparations Avizyme<sup>®</sup> 1300 (*Trichoderma longibrachiatum*, *T. viride*), Biofeed plus<sup>®</sup> (*Humicola insolens*), Biofeed Wheat<sup>®</sup> (*Aspergillus oryzae*), Lyxasan<sup>®</sup> (*A. niger I*), Roxazyme<sup>®</sup> (*T. viride*), Barlican<sup>®</sup> (*T. reesei I*), Biopract<sup>®</sup> (*T. reesei II*), Energex<sup>®</sup> (*A. niger II*), Novozyme 104<sup>®</sup> (no declaration), and Hostazym X<sup>®</sup> (no declaration) were purified, their activities and substrate specificities determined. The enzymes were classified in xylanase and  $\beta$ –glucanase main activities. The enzyme preparations consisted of mixtures of different enzymes, differing in isoelectric point, pH behaviour. They contained at least two xylanase activities except Biofeed Wheat<sup>®</sup> (*Aspergillus oryzae*) which contained only one. The latter is produced by the genetically engineered fungus *Thermomyces lanuginosus*. The comparison of the *A. niger*– and *T. reesei*–preparations showed that proportions among the expressed enzymes are influenced by strain selection or fermentation control. The analysis of hydrolytic products showed a profile for each enzyme preparation which was independent from the enzyme concentration. The different distribution of hydrolytic products influenced the activity estimations which depend on the determination of hydrolytic products. This behaviour was shown by the different ascents of the calibration curves. Thus, it is generally necessary to generate a separate calibration curve for each enzyme preparation.

The reducing sugar assay was used to calibrate the enzyme activities of the different preparations. So that the same enzyme concentration could be used for all enzyme assays. This test is

only usable in buffer but not in cereal extracts or other solutions that contain reducing components.

#### Chromogenic substrates:

Chromogenic substrates were xylans or  $\beta$ -glucans ionically or covalently coupled with a dye. The enzymatic hydrolysis frees the ionic dye or produces small hydrolytic products with covalently coupled dye. Different dyes (covalently, anionically, cationically coupled) and different substrates (ultrasonicated, autoclaved, carboxymethylated) were combined with chromogenic substrates and tested in enzyme assays. These preparations were not superior to commercial preparations.

#### Viscosity measurements:

This enzyme assay depends on viscosity reduction from enzymatic hydrolysis. The substrates were chemically or physically modified oat spelt xylan, native arabinoxylan, or barley  $\beta$ -glucan. Ultrasonicated oat spelt xylan allowed the xylanase activity to be measured in small volumes (0.5 ml, rotation viscosimeter) without measuring the initial viscosity of the substrate, because no initial increase of the viscosity was observed after addition of enzyme and there was sufficient viscosity reduction after incubation.

#### Agar diffusion assay:

After incubation of enzyme solutions inside the wells of an agar plate containing substrate (xylan,  $\beta$ -glucan) the plate was stained with congo red. Congo red is bound by highmolecular polysaccharide. Enzymatic hydrolysis is shown after red staining as clear lysis zones. The range and detection limit was improved using modified substrates (ultrasonicated or autoclaved) and a digital photodocumentation system instead of the visual evaluation. The use of ultrasonicated oat spelt xylan showed brighter and larger lysis zones in all enzyme–matrix combinations. The results were better evaluable than the results with unmodified or autoclaved oat spelt xylan. Because of complete enzymatic degradation there were no undegraded highmolecular molecules.

#### Dye reaction:

A new method for the determination of xylanase activities was evaluated. Soluble ultrasonicated oat spelt xylan was hydrolysed and hydrolytic products bound reactive green. In sodium acetate buffer the detection limit of enzyme activity was 0.005 IE/ml, in feed stuff extract about 0.05 IE/ml.

The results of this work show that each enzyme detection method must be calibrated to each enzyme preparation.

