

1. Einleitung

In der Tierernährung werden verschiedene Enzyme eingesetzt, um bei landwirtschaftlichen Nutztieren antinutritive Effekte pflanzlicher Futtermittel zu beseitigen und die Futterverwertung zu verbessern [BEDFORD 1995, CHOCT UND ANNISON 1990]. Nichtstärkepolysaccharide (NSP) abbauende Enzyme unterstützen die Verdauungskapazität körpereigener Enzyme, indem viskositätsbildende Futterkomponenten, für die das Tier keine eigenen Enzyme besitzt, partiell hydrolysiert werden, und durch körpereigene Enzyme verdauliche Nahrungsbestandteile auf Grund einer Solubilisierung von Zellwandkomponenten dem enzymatischen Abbau besser zugänglich gemacht werden. So senken Xylanasen und β -Glucanasen die Viskosität des Nahrungsbreis im Verdauungstrakt und fördern dadurch die Verdaulichkeit der Hauptnährstoffe z.B. bei Broilern [MARSMAN ET AL. 1995, ROTTER ET AL. 1990, ANDERSON ET AL. 1961, HESSELMAN ET AL. 1982, CAMPBELL ET AL. 1986, CLASSEN ET AL. 1985, MARQUARDT ET AL. 1996, CHESSON 1993, CASTANON ET AL. 1997, FUENTE ET AL. 1998, GRAHAM 1993].

Kommerzielle Nichtstärkepolysaccharide (NSP) spaltende Enzyme werden meist durch Fermentationsprozesse mit Pilzen hergestellt. Der Einschluß NSP-spaltender Enzyme in die EU-Futtermittelzusatzstoffdirektive hat folgende Forderung an die Enzymanalytik gestellt: da die Enzyme in den Beschreibungen der Futtermittel als Zusatzstoffe deklariert werden müssen, verlangen die zuständigen Behörden eine Testmethode zur Enzymaktivitätsbestimmung im Futtermittel, damit die beigemengten Enzyme tatsächlich den Konzentrationen entsprechen, die in Produktspezifikationen angegeben sind [PARTRIDGE 1997].

Das geltende Futtermittelrecht faßt alle Wirkstoffe (Vitamine, Spurenelemente, Leistungsförderer etc.) unter dem Begriff Futterzusatzstoffe zusammen. Juristisch gelten für Enzyme in Futtermitteln die gleichen Anforderungen, wie sie an andere Futterzusatzstoffe gestellt werden. Ihre Unbedenklichkeit für das Tier und den Menschen als Endverbraucher muß gesichert, die Wirksamkeit erwiesen und die Kontrollierbarkeit gewährleistet sein [GRASSMANN 1996, § 18 FUTTERMITTELVERORDNUNG 1987, KIRCHGESSNER 1997].

Um die Kontrollierbarkeit und die Wirksamkeit zu gewährleisten, ist es notwendig, die Aktivitätsbestimmung von Enzymen in komplexen Proben mit einfachen, aber exakten Methoden weiter zu optimieren.

2. Problemstellung

Der quantitative Nachweis von Enzymaktivität in komplexen Proben wie Futtermitteln und Digestaprobe ist ein erhebliches Problem, weil die üblichen Enzymaktivitätsbestimmungsmethoden durch die Probenmatrix beeinflusst werden. Bestimmungsmethoden für gereinigte Enzympräparate in wässrigen Medien, wie z.B. die Aktivitätsbestimmung mittels Dinitrosalicylsäure wird durch den reduzierenden Hintergrund in komplexen Proben unmöglich. Andere Bestimmungsmethoden, wie z.B. chromogene Substrate werden durch Nebenreaktionen der Farbstoffe beeinflusst. Der quantitative Nachweis ist aber für die futtermitteltechnische Prozeßkontrolle zur Stabilitätskontrolle bei der Lagerung [FUENTE ET AL. 1998] von Futtermitteln sowie aus rechtlichen Gründen erforderlich.

Enzyme sind keine Substanzen mit definiertem chemischen Verhalten, wie z.B. Salze oder Vitamine. Enzympräparate bestehen aus einem Gemisch von mehreren verschiedenen Enzymmolekülen. Eine direkte Enzymbestimmung über chemische Methoden (z.B. UV-Absorption, Fällungsreaktion, etc.) ist nicht möglich. Direkt ist eine Detektion über Antikörper möglich, diese reagieren aber nur auf ein bestimmtes Enzymmolekül, ohne zu unterscheiden, ob es sich um ein aktives Enzym handelt oder nicht. Die Aktivitäten NSP-spaltender Enzyme können nur indirekt über die Wirkung auf spezifische Substrate bestimmt (Xylane für Xylanasen, β -Glucane für β -Glucanasen) werden, wobei die ermittelte Enzymaktivität von den Substrateigenschaften abhängt.

Enzyme, die als Futterzusatzstoffe mit der gleichen Beschreibung — am verbreitetsten sind Xylanasen bzw. β -Glucanasen — verwendet werden, können sich erheblich in ihren Eigenschaften (Anzahl der aktiven Komponenten, pH-Optimum, etc.) [VAHJEN UND SIMON 1999] unterscheiden. Zusätzlich beeinflussen verschiedene Faktoren im Getreide, wie z.B. getreideeigene Enzyme, Inhibitoren und reduzierende Substanzen die Enzymaktivitätsbestimmung. Die Konzentration der in das Futtermittel gemischten Enzyme ist sehr gering, von Glucanasen werden ca. 600 IE/kg (Internationale Einheit) und von Xylanasen 1000–2000 IE/kg verwendet. Das entspricht einer Präparatmenge von 100–500 mg/kg Futtermittel. Die Extraktion der Enzyme aus der fertigen Futtermittelmischung ist abhängig von der Art des Enzyms (z.B. Substrataffinität, isoelektrischer Punkt).

Einige Enzyme binden stärker an das spezifische Substrat (z.B. an Xylane) als andere. Deshalb können niedrige scheinbare Wiederfindungen als inaktiviertes Enzym interpretiert werden, aber tatsächlich kann es sich um aktives Enzym mit hoher Substrataffinität handeln [PARTRIDGE 1997].

Die Kontrollprobe „Futtermittel ohne zugesetztes Enzym“ ist häufig nicht vorhanden, d.h. die Aktivität von getreideeigenen Enzymen und andere „Matrixeffekte“ können in der Kontrollprobe nicht berücksichtigt werden. Sie könnten durch Inaktivierung des Enzyms, z.B. durch Erhitzen der Probe, erzeugt werden. Dabei werden jedoch gleichzeitig die Eigenschaften des Futtermittels verändert, weil sowohl die zugesetzten als auch die getreideeigenen Enzyme inaktiviert und die Löslichkeit von Kohlenhydraten erhöht werden. Auch wird eingelagertes Wasser entfernt und dadurch die Makrostruktur des Futtermittels verändert.

Aus diesen methodischen Problemen zur Enzymbestimmung in komplexen Proben ergeben sich folgende Zielstellungen:

- **Charakterisierung der verwendeten Futterzusatzenzyme**
Die verschiedenen Enzym- (Roh)präparate sollen so charakterisiert werden, daß Faktoren, die den enzymatischen Nachweis beeinflussen, erkannt werden und gegebenenfalls in der Versuchsdurchführung berücksichtigt werden können. Dazu muß die Substratspezifität der Enzyme mit einer einheitlichen Methode bestimmt werden, um die Enzympräparate untereinander vergleichen zu können. Die thermische Stabilität muß bestimmt werden, da Futtermittel bei Temperaturen bis 80°C und höher pelletiert werden. Das pH-Optimum der Enzyme muß bekannt sein, um die Wirkungsmöglichkeit in verschiedenen Segmenten des Verdauungstraktes einschätzen zu können. Ferner sollen die Anzahl der aktiven Enzyme innerhalb des Enzympräparates und deren isoelektrischer Punkt bestimmt werden. Die Verteilung der enzymatischen Abbauprodukte von den untersuchten Enzympräparaten muß analysiert werden, da durch sie die Enzymaktivitätsbestimmung und die Wirkung im Tier am stärksten beeinflusst wird.
- **Entwicklung von Testsubstraten**
Diese sollen einheitlich in Enzymtests reagieren, die enzymatische Abbaureaktion aber nicht behindern (z.B. durch eingeführte funktionelle Gruppen, Farbstoffe, etc.), gut löslich sein und als Standard eingesetzt werden können, so daß die Empfindlichkeit der Enzymaktivitätsbestimmung von der gelieferten Substratcharge unabhängig wird. Für die Normierung des Substrats war geplant, dieses chemisch bzw. enzymatisch partiell zu hydrolysieren oder physikalisch zu zerkleinern und anschließend durch Filtration nach Molekülgröße aufzutrennen und die so normierten Substrate für Enzymtests einzusetzen.
- **Bestimmung der Aktivität von zugesetzten Enzymen in komplexen Proben**
Die enzymatische Aktivität in Futtermittelmischungen und Digestaprobe muß geprüft werden. Dabei sollen die modifizierten Substrate/Methoden eingesetzt werden.

3. Grundlagen

3.1 NSP-hydrolysierende Enzyme, die als Futterzusatzstoffe von Bedeutung sind

Das Cellulose- bzw. β -Glucan-Molekül wird von endo- β -1,4-Glucanasen in große Glucanoli-gosaccharide gespalten. An den freien Enden dieser Makromoleküle greifen die exo- β -1,4-Glu-canasen an und spalten Tri- bzw. Disaccharide ab. Diese werden von β -1,4-Glucosidase in Glu-cosemoleküle zerlegt. Das Xylan-Molekül wird von endo-1,4- β -Xylanasen partiell in Xylanoli-gosaccharide hydrolysiert. Exo-1,4- β -Xylanasen spalten das Molekül in kleinere Einheiten bis zur Xylobiose. Diese werden von β -Xylosidasen bis zur Xylose gespalten. Endo-Xylanasen kön-nen Xylanmoleküle nur innerhalb des Moleküls hydrolysierten; ein exo-Enzym greift nur end-ständig an und hydrolysiert nur die linearen Xylanketten bis zur nächsten Verzweigung. Zur Be-stimmung von exo-Enzymen sind alle in dem Abschnitt „Häufig angewendeten Methoden zur Enzymbestimmung“ aufgeführten Methoden anwendbar, da sie bis auf die Methode der Visko-sitätsabsenkung alle auf die Detektion kleiner Hydrolyseendprodukte ausgelegt sind.

Es gibt 4 endo- β -Glucanasen mit ausgeprägter Spezifität [BORRISS 1994]:

1. Die Cellulasen E.C. 3.2.1.4:

Cellulasen spalten 1,4-Bindungen in Cellulose und β -Glucanen. Daher wird Cellulose (CMC) und Lichenin (1,3-1,4-Bindung) gespalten, nicht aber Laminarin (1,3-Bin-dung).

2. Rhizopus-Glucanase E.C. 3.2.1.6:

Diese Enzyme hydrolysieren sowohl 1,3- als auch 1,4-Bindungen, vorausgesetzt sie befinden sich neben einer 1,3-Bindung. Diese Konstellation ist nur bei Cellulosemole-külen nicht gegeben, welches auch als einziges β -Glucan nicht gespalten wird.

3. Laminarinasen E.C. 3.2.1.39:

Laminarinasen spalten nur 1,3-Bindungen in Nachbarschaft von 1,3-Bindungen und daher nur Laminarin.

4. Lichenasen E.C. 3.2.1.73:

Von diesen Enzymen werden nur 1,4-Bindungen gespalten, wenn sie sich neben einer 1,3-Bindung befinden, daher werden Lichenin sowie 1,3-1,4- β -Glucane, wie sie im Getreide vorkommen, gespalten.

und Xylanasen:

Xylanasen E.C. 3.2.1.8:

Von diesen Enzymen werden β -1,4-Bindungen im Xylopyranose-Rückgrat von Arabinoxylanen hydrolysiert.

Die NSP-spaltenden Enzyme werden meist aus Pilzen hergestellt. Als Flüssigpräparate werden sie als ultrafiltrierte Lösung von Submerskulturen pilzlicher Herkunft geliefert, die mit Sorbitol bzw. Glycerol stabilisiert sind. Als Festpräparat sind sie gefriergetrocknet, als Pulver auf Weizenbasis oder mit Trägermaterialien umhüllt („coating“). In dieser Arbeit werden die Substratspezifitäten der verschiedenen Enzympräparate sowie Methoden zur Bestimmung von Xylanasen und β -Glucanasen untersucht und weiterentwickelt.

3.2 Substrate zur Enzymaktivitätsbestimmung

Als Substrate zur Enzymaktivitätsbestimmung werden üblicherweise Xylane verschiedener Herkunft (Weizen, Hafer oder Birke) sowie die β -Glucane Lichenin, Laminarin und Carboxymethylcellulose (CMC) verwendet.

3.2.1 Xylane

Xylan ist ein lineares Polymer aus Xylose welches in der 1,4- β -Konfiguration glycosidisch verknüpft ist [STÜTTGEN 1981]. Xylose gehört zu den Pentosen, die zu Xylopyranosen cyclisieren können. Die Seitenketten differieren je nach Herkunft des Xylans (Abb. 1, hypothetisches Xylan [BIELY 1985]). Die einfachste Form ist das Esparto-Xylan. Es besteht aus β -1,4-verknüpften Xylopyranosyleinheiten ohne Substituenten, aber mit einigen Seitenketten [PULS ET AL. 1988, HIRST ET AL. 1950].

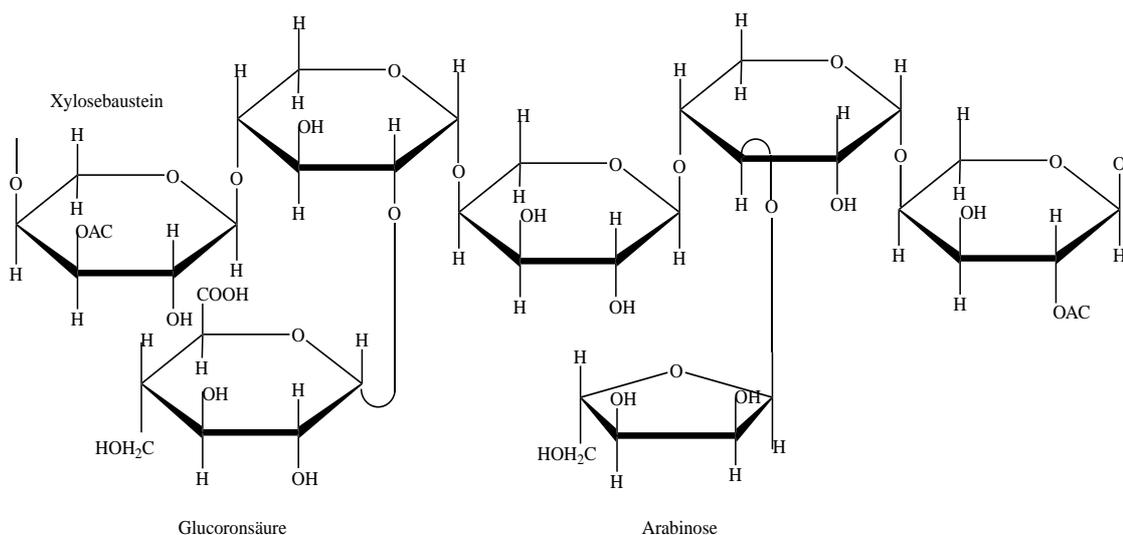


Abbildung 1: Hypothetisches Xylan, BIELY 1985

Landpflanzenxylane sind durch eine 1,4- β -verknüpfte D-Xylopyranosyl-Hauptkette charakterisiert, welche eine große Anzahl von verschiedenen Seitenketten von neutralen über saure bis hin zu Oligosaccharid-Substituenten tragen kann [JOSELAU ET AL. 1992]. Es sind nur wenige unverzweigte Xylane isoliert worden, z.B. aus Espartogras [CHANDA UND PERCIVAL. 1950] und Tabakstengeln [MARCHESSAULT ET AL. 1961].

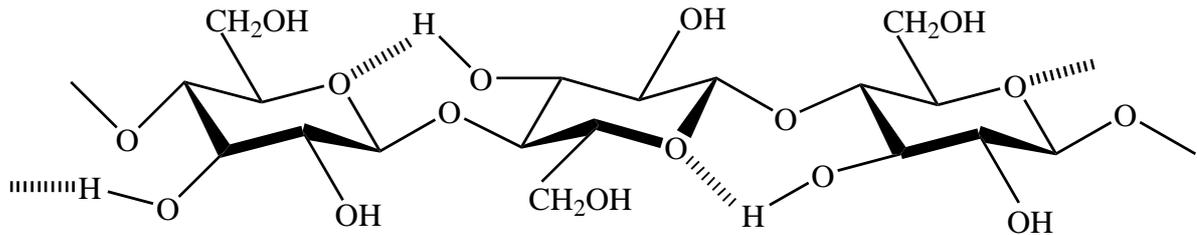
Arabinoxylan aus Weizen hat die höchste Molmasse von bis zu 10^7 – 10^8 M (GRUPPEN 1992). Das entspricht einem Polykondensationsgrad von rd. 6×10^5 – 6×10^7 β -glycosidisch verknüpften Xyloseeinheiten. Es hat einen hohen Anteil an Arabinofuranosegruppen, einen geringen Anteil an 4-O-Methyl- β -D-Glucuronsäureresten und keine Acetylgruppen. Wegen der fehlenden Säurereste und der sehr großen Molmasse ist Arabinoxylan sehr schlecht in Wasser löslich.

Nadelholzxyylan besteht aus einer Hauptkette von 100–120 β -glycosidisch verknüpften Xyloseeinheiten. Jede 4.–5. Xylopyranoseeinheit trägt eine 4-O-Methyl- β -D-glucuronsäuregruppe, jede 8.–9. eine Arabinofuranosegruppe.

Laubholzxyylan besteht aus etwa 200 β -glycosidisch vernetzten Xyloseeinheiten. Jede 10. Xylopyranoseeinheit trägt einen 4-O-Methyl- β -D-Glucuronsäurerest, es hat keine Arabinofuranosegruppen, statt dessen sind von 10 Xyloseresten 6–7 mit einer Acetylgruppe substituiert [BATZER 1986, LANGE 1982]. Durch die hohe Zahl von Acetylgruppen sind in dem Molekül weniger intramolekulare Wasserstoffbrücken vorhanden. Aufgrund der kleineren Molmasse und der sterischen Hinderung durch die Substituenten ist es gut in Wasser löslich.

3.2.2 β -Glucane

β -Glucan besteht aus 1,3- bzw. 1,4- β -glycosidisch vernetzten Glucopyranosen (Hexosen). In der Stereochemie bedeutet α , daß die Bindung unterhalb des Ringes ist; β bedeutet in Haworthformeln, daß die Bindung oberhalb des Ringes ist [STRYER 1990]. Hochmolekulares β -Glucan kommt bis zu 75% in den Zellwänden von Gramineen (Hafer, Gerste, Weizen, Mais, Hirse) vor. Lichenin ist das Reservepolysaccharid der Flechte *Cetraria islandica* („Isländisches Moos“). Es hat eine ähnliche Struktur wie das Cerialien- β -Glucan. Wegen seiner einfachen Herstellung wird es häufig als Modells substrat zur Bestimmung von 1,3-1,4- β -Glucanasen verwendet [BORRISS 1994]. Cellulose ist ein lineares Polymer aus Glucosemolekülen, die in der 1,4- β -Konfiguration verknüpft sind (Abb. 2, Cellulose [STRYER 1990]). Die Struktur der Cellulose wird durch Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Glucoseeinheiten innerhalb der gleichen Kette stabilisiert. Zusätzlich bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen den verschiedenen Ketten aus. Cellulose ist ein Modells substrat für 1,4- β -verknüpfte Glucane. Ein Modells substrat für 1,3- β -vernetzte Glucopyranosen ist das Laminarin. Es kommt in bestimmten Algenarten vor.

Abbildung 2: Cellulose (β -1,4-Bindungen), Stryer 1990Tabelle 1: β -Glucan- und Pentosangehalte in Getreiden (g/kg TS) [JEROCH 1998]

Getreideart	Gerste	Roggen	Hafer	Weizen	Triticale	Mais
β -Glucane, gesamt	26-66	18-47	23-51	6,5-8,5	7-36	1,2
β -Glucane, löslich	24-50	-	16	-	4	-
Pentosane, gesamt	31-60	66-122	37-80	62-75	46-86	43
Pentosane, löslich	5-8	19-27	8	8-12	6-11	-

In Tabelle 1 sind die löslichen und unlöslichen Pentosan- (Xylan) und β -Glucangehalte der verschiedenen Getreide aufgeführt. Roggen hat den höchsten Anteil an unlöslichen Pentosan, Gerste den geringsten. Gerste hat den höchsten β -Glucangehalt.

3.3 Futtermittel

Einzelfuttermittel bestehen aus einem einheitlichen Material, wie z.B. den Körnern der verschiedenen Getreidearten oder dem bei einem technischen Prozeß anfallenden Material, wie z.B. Fischmehl, Sojaschrot, Weizenkleie etc. Mischfuttermittel enthalten eine spezielle Kombination der Gemengteile, die auf einen Ausgleich vom Nährstoffgehalt und eine gegenseitige Ergänzung der übrigen Qualitätseigenschaften abgestimmt sind. Bei Broiler- und Ferkelrationen ist Getreide die Hauptkomponente (60-70%). In dieser Arbeit verwendete Ferkelfutter enthalten ca. 30% Gerste und ca. 36% Weizen, Broilerfutter ca. 30% Weizen und ca. 30% Mais. An NSP enthält Gerste β -Glucane und Arabinoxylane, Weizen überwiegend Arabinoxylane, Mais Arabinoxylane und keine β -Glucane.

3.4 Literaturübersicht

3.4.1 Häufig angewendete Methoden in der Enzymanalytik

Die Reduzierende-Zucker-Methode (Nach dem Reagenz 3,5-Dinitrosalicylsäure (2-Hydroxy-3,5-dinitro-benzoesäure) auch DNSS-Test genannt): Diese Methode zur Enzymaktivitätsbestimmung beruht auf der Freisetzung von Reduktionsäquivalenten aus den Substraten [MILLER 1959, BAILEY 1988]. Die Konzentration der enzymatisch hydrolysierten Endprodukte wird colo-

rimetrisch durch Reaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSS) bestimmt. Eine Internationale Einheit ist definiert als die Enzymkonzentration, welche 1 μmol Reduktionsäquivalente als Glucose- oder Xyloseoligomere (es macht keinen Unterschied ob Glucose- oder Pentosemoleküle als Bezugsäquivalente verwendet werden, da es nicht auf die Anzahl der Atome im Pyranosemolekül, sondern auf die Anzahl der freigesetzten reduzierenden Gruppen ankommt) pro Minute bei 50°C freisetzt. Diese Methode ist nur für aufgereinigte Enzyme und Rohpräparate (aus Fermentationsbrühen aufkonzentrierte Enzymlösungen) geeignet. Die Bestimmung von endo-Enzymen wird durch die Anwesenheit von exo-Enzymen beeinflusst, weil durch sie in kürzerer Zeit eine höhere Konzentration reduzierender Gruppen entsteht. Eine Enzymaktivitätsbestimmung in Futtermittlextrakten und Digestaüberständen ist mit dieser Methode nicht möglich, da der hohe Anteil von anderen reduzierenden Substanzen, wie z.B. Polysacchariden, Metallionen etc. die 3,5-Dinitrosalicylsäure ebenfalls reduziert.

Enzymaktivitätsbestimmung mit chromogenen Substraten: Es handelt sich um Xylane oder β -Glucane, die einen Farbstoff gebunden haben. Der Farbstoff kann kovalent oder ionisch an das Substrat gebunden sein. Die Hydrolyse von Substraten mit ionischgebundenen Farbstoffen setzt den Farbstoff frei [WOOD 1982, 1985]. Enzymatische Hydrolyse von Substraten mit kovalent gebundenen Farbstoffen setzt niedermolekulare Hydrolyseprodukte mit gebundenem Farbstoff frei. Durch Zugabe von Ethanol werden die hochmolekularen Hydrolyseprodukte ausgefällt, die niedermolekularen Hydrolyseprodukte mit dem gebundenen Farbstoff bleiben in Lösung. Die Absorptionsdifferenz des Überstandes zwischen ungefällten und gefällten Hydrolyseprodukten wird photometrisch gemessen und entspricht der Enzymaktivität. Die Fa. Megazyme in Irland [MCCLEARY 1995] vertreibt vernetztes Weizenxyylan mit kovalent gebundenem RBB. Die enzymatische Reaktion wird durch pH-Verschiebung gestoppt. Die freigesetzten Hydrolyseprodukte werden durch Filtration getrennt. Die Absorptionsdifferenz des Filtrats wird photometrisch gemessen und entspricht der Enzymaktivität. Die Vorteile der colorimetrischen Methode sind die einfache Handhabbarkeit und Reproduzierbarkeit, ihre Nachteile sind die relativ hohen Kosten und die Tatsache, daß diese Substrate mit den angekoppelten Farbstoffen nativ in Futtermitteln nicht auftreten, daß durch die Kopplung die Bindungscharakteristika des Substrats für die Reaktion mit dem Enzym verändert werden und die freigesetzten Hydrolyseprodukte mit gekoppelten Farbstoffen mit anderen Komponenten weiter reagieren können. Auch wird diese Methode durch die Anwesenheit von exo-Enzymen beeinflusst, da durch diese mehr niedermolekulare Hydrolyseprodukte mit gekoppelten Farbstoffen entstehen, die bei Zugabe von Ethanol in Lösung bleiben und so eine höhere Absorption verursachen. Kommerziell erhältliche chromogene Substrate sind das carboxymethylierte Weizenxyylan bzw. Birkenholzxyylan, Glucazytabletten (β -Glucan mit Azurin) von der Fa. Megazyme in Irland [MCCLEARY 1995] mit kovalent

gebundenem Remazol Brilliant Blue (RBB) und das vernetzte Weizenxylylan mit kovalent gebundenem RBB, bzw. vermutlich Azurin B. Die Fa. Sigma, Deisenhofen, vertreibt Birkenholzxylylan mit kovalent gebundenem RBB [BIELY 1985].

Messung der Viskositätssenkung nach MCCLEARY [1995] bzw. GIST-BROCADES [1996]: Die Enzymaktivitätsbestimmung beruht auf der Absenkung der Viskosität einer Substratlösung durch enzymatische Hydrolyse. Substrate sind natürlicher Herkunft, wie z.B. Arabinoxylane und β -Glucan, Weizenextrakte [PACK UND BEDFORD 1998] oder chemisch modifiziert, wie z.B. Carboxymethylcellulose oder der Xylanschwefelsäureester [HUSEMANN ET AL. 1950]. Der Vorteil chemisch modifizierter Substrate ist, daß sie besser löslich sind. Nachteilig wirkt, daß durch chemische Modifikation (Einführung der Carboxymethylgruppe [MCCLEARY 1982] bzw. der Schwefelsäuregruppe über Chlorsulfonsäure [HUSEMANN ET AL. 1950]) die Enzyme schlechter an das Substrat anlagern können. Der Nachteil von unmodifizierten Substraten ist, daß sie wegen der großen Molmasse schlecht löslich sind und dadurch die ermittelten Enzymaktivitäten eine starke Streuung haben. Ein weiterer Nachteil ist, daß bei der Verwendung von Kugelfallviskosimetern notwendige große Probenvolumen von 200–500 ml (Mikrokugelfallviskosimeter 5–10 ml, Fa. Haake). Für die Enzymbestimmung im Futtermittel wirkt erschwerend, daß sowohl die eigentlichen Substrate als auch viele andere Komponenten die Viskosität der Lösung beeinflussen.

Agardiffusionstest: In der Methode nach WOOD (1988), SIMON (1994) und EDNEY ET AL. (1986) wird die enzymhaltige Lösung auf eine Agarplatte, welche ein geeignetes Substrat (Xylane, β -Glucane) enthält, in zuvor in die Agarplatte gestanzten Löchern, inkubiert. Anschließend wird die Agarplatte mit Kongorotlösung unter Schwenken gefärbt und danach beim Waschen mit einer NaCl-Lösung wieder entfärbt. Kongorot färbt nur die Bereiche der Platte an, die hochmolekulares Substrat enthalten. Durch enzymatische Aktivität entstehen um die Löcher, die mit Enzymlösung gefüllt waren, helle runde Lysezonen, deren Größe der Enzymaktivität entspricht. Weil diese Methode durch Matrixfaktoren beeinflusst wird, sind Kalibrationen nur in Anwesenheit der Faktoren möglich. So muß z.B. der gesamte Extrakt des Futtermittels mit aufgetragen werden. Ein weiterer Nachteil ist, daß die Methode substratabhängig (verschiedene Xylanchargen ergeben unterschiedliche Ergebnisse), durch die Auswertung der Lysezonen mittels Lineal vergleichsweise unempfindlich (Nachweisgrenze 0,1 IE/ml) und damit ungenau ist.

Unter anderem gibt es noch die immunologische Enzymbestimmung: Immunologische Methoden basieren auf Antikörpern gegen ein bestimmtes Enzym. Diese Methoden sind empfindlich und spezifisch, aber teuer. Sie können wegen Ihrer Enzymspezifität auch für die Unterscheidung von exo- und endo-Enzymen eingesetzt werden. Für Tests mit immunologischen Enzymbestimmungsmethoden in Futtermitteln müssen genau die für das Enzymmolekül passenden Antikörper-

per eingesetzt werden, da sie sonst sehr unspezifisch binden und deshalb kein Nachweis im Futtermittel möglich ist [PARTRIDGE 1997]. Schwierig wird dann auch der Nachweis von Enzympräparaten die mehrere verschiedene aktive Moleküle haben. Antikörper reagieren auf strukturelle Einheiten und deshalb auch mit inaktiven Enzymen oder Bruchstücken.

3.4.2 Verwendung modifizierter Substrate

Einführung einer detektierbaren Gruppe in das Substrat:

Wood und Fulcher [WOOD UND FULCHER 1978; WOOD 1980] untersuchten die Reaktionen (Änderungen von Löslichkeiten, Absorption und Fluoreszenz) einiger ionischer Farbstoffe, wie Calcufluor, Tinopal, Kongorot, Trypan-Blau, Brilliant Yellow mit Polysacchariden (Haferspelenxylan, Laminarin, β -Glucan etc.), die aus 1,4- β -verknüpften Glucopyranosyleinheiten bestehen. Der Farbstoff ist ionisch gebunden und in das Makromolekül eingeschlossen. Er wird durch die Hydrolyse des Substrats freigesetzt. Diese Reaktionen wurden für histochemische Methoden und zur Bestimmung von Reinezym verwendet [WOOD 1982, 1985].

Biely [1985] verwendete im Agardiffusionstest mit Hydroxyethylcellulose mit kovalentgebundenem Ostazin Brilliant Red H3b oder löslichem Birkenholz-4-O-Methyl-D-Glucuron-D-Xylan mit kovalent gebundenem Remazol Brilliant Blue R für die sensitive Detektion von mikrobiellen Cellulase- und Xylanaseproduzenten, wie *Trichoderma reesei* bzw. *T. viride*, welche endo-1,4- β -Glucanasen und/oder 1,4- β -Xylanasen herstellen und an das umgebende Medium abgeben. Die abgeschiedenen Polysaccharid-Hydrolasen wurden durch helle Lysezonen, welche sich um die Mikroorganismenkolonien bilden, angezeigt. Es handelte sich um reine Enzyme. Es wurde kein Enzymaktivitätsbereich angegeben.

Lösliche chromogene Substrate für den schnellen und spezifischen Enzymtest von endo-1,4-Xylanasen und endo-1,4- β -Glucanasen wurden aus löslichem Birkenholz-4-O-Methyl-D-glucurono-D-Xylan und Remazol Brilliant Blue R bzw. aus löslicher Hydroxyethylcellulose mit gekuppeltem Ostazin Brilliant Red H3b hergestellt. Die Enzymtests basierten auf der photometrischen Messung der enzymatisch hydrolysierten gefärbten Fragmente, welche in der Anwesenheit organischer Lösungsmittel in Lösung blieben und nicht, wie die hochmolekularen Komponenten der unhydrolysierten Originalsubstrate bei Zugabe von dem doppelten Volumen an Ethanol ausfallen. Es wurde die Farbstofffreisetzung durch 0,5 IE β -Glucanase (*T. viride*) in Abhängigkeit von der Zeit untersucht [BIELY 1985, 1988].

McCleary [1987] bestimmte die Aktivität von Malz- β -Glucanase mittels Azo-Barley-Glucan (Remazolbrilliant Blue gefärbtes Barley Glucan). Die Aktivitätsbestimmung der reinen β -Glucanase erfolgte im Bereich von 50–550 IE/kg Malz. Die Enzymaktivitätsbestimmung von

β -D-Mannanase durch mit Remazolbrilliant Blue gefärbtes D-Galacto-D-mannan wurde von McCleary [MCCLEARY 1978] entwickelt. Sie konnte für die Bestimmung von β -D-Mannanase in rohen Enzympräparaten eingesetzt werden. Als chromogene Substrate zur Bestimmung von α -Amylase und 1,4- β -Glucanase wurden Carboxymethylcellulose mit Remazolbrilliant Blue bzw. Remazolbrilliant Black B, Carboxymethylamylose und Carboxymethylstärke mit Remazolbrilliant Blue eingesetzt [MCCLEARY UND ANDERSON 1980]. Enache stellte chromogene Substrate zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Cellulasen durch selektive Bindung reaktiver Chlortriazinfarbstoffe (Rot M3A, Rot MB, Rot B5A, Blau MV, Violett M3R) her [ENACHE 1986]. Zur selektiven und quantitativen Bestimmung von α -Amylasen wurden durch kovalente Bindung von Antrachinon- und Chlortriazinfarbstoffen an vernetzte Stärke chromogene Substrate hergestellt [MAIOR 1985]. Carboxymethylcellulose wurde mit dem farbigen Kation Rutheniumrot gekoppelt und als gefärbtes Substrat zur Bestimmung von endo-1,4- β -Glucanasen für Enzymtests eingesetzt [RESCIGNO ET AL. 1994].

Mit Tritium gelabelter D-Xylotriase und D-Xylooctase aus Lärchenxylan bestimmt Meagher die Michaelis-Menten-Kinetik und „subsite mapping“ einer D-Xylobiose und D-Xylose produzierenden aus *Apergillus niger* isolierten endo-(1,4)- β -D-Xylanase. Die Michaeliskonstante nahm monoton mit zunehmender Kettenlänge bis zum Xylohexamer zu und dann leicht über das Xyloheptamer bis zum Xylooctamer ab. Die Bindungslösungsfrequenz ist am höchsten nahe dem reduktiven Ende der kurzen Substrate. Bei größeren Substraten bewegten sich die mit dem höchsten Lösefrequenzen der Mitte zu. Die Xylanase hat fünf Subsites mit der katalytischen Seite zwischen der dritten und vierten Subsite, wenn von dem nichtreduzierenden Ende des gebundenen Substrates gezählt wird [MEAGHER ET AL. 1988]. Durch Dotierung mit D₂O wurde die stereoselektive Hydrolyse von 2,4-Dinitrophenyl- β -cellobiosiden und 2,4-Dinitrophenyl β -Xylobiosiden durch verwandte β -1,4-Glucanasen und β -1,4-Xylanasen in der NMR verfolgt [GEBLER ET AL. 1992].

(Di-)Nitrophenolate sind gute Abgangsgruppen und ermöglichen, die Hydrolyse von substituierten Glycosylen photometrisch zu erfassen. Die 2,4-Dinitrophenyl- α - und β -Galactoside, β -Glucoside, α -D-Mannoside, α - und β -L, D-Arabinoside, β -D-Xyloside und 2-Chlor-2-desoxy- β -D-Galactoside wurden über O-Trimethylsilyl-glycosylhalogenide mittels der Königs-Knorr-Reaktion [KOENIGS UND KNORR 1901, HENGSTENBERG UND WALLENFELS 1969] oder über die Acetohalogenzucker [BÁRCZAI-MARTOS 1950], wobei die 2,4-Dinitrophenylgruppe, bzw. die o- und p-Nitrophenylgruppe, nach der Vorschrift von Ballardie [BALLARDIE ET AL. 1973] in Glycopyranoside eingeführt wurde, synthetisiert. Die (Di)-Nitrophenylglycoside wurden als Substrate zur Untersuchung der *Agrobacterium faecalis* β -Glucosidase [KEMPTON UND WHITHERS

1992, KOENERS 1980], *Bacillus subtilis*-Xylanase [ZISER ET AL. 1995], der *Cellulomonas fimi* exo- β -1,4-Glucanase [TULL UND WITHERS 1994] und der gereinigten *Bacillus Pumilus* Xylanase [TAGUCHI 1996] eingesetzt.

McCarter synthetisierte 2-Desoxy-2-Fluor-Mono- und Oligo-saccharidglycosiden aus Glycosiden indem er verschieden fluorierte Oligosaccharide, 2-Desoxyfluor-Derivate von Cellobiose, Maltose, Maltotriose durch Reaktion mit Fluor oder mit Acetylhypofluorit aus den korrespondierenden Glycolperacetaten herstellte. Mit diesen Substraten untersuchte er die Kinetik der Enzymreaktion von β -Amylase und dem Glycogen abbauenden Enzym *Cellulomas fimi* (exo-Glucanase) durch die Freisetzung von fluoridsubstituierten Hydrolyseprodukten [MCCARTER ET AL. 1993].

Mittels ^{19}F NMR identifizierte Withers eine kovalente β -D-Glucopyranosyl- β -glucosidase-Zwischenstufe bei der Hydrolyse von 2-Desoxy-2-Fluor- β -D-Glucopyranosylfluorid durch eine β -Glucosidase von *Alcaligenes faecalis* [WITHERS UND STREET 1988].

Die endo-1,4- β -D-Glucanase-Aktivität wurde kontinuierlich photometrisch mittels HPLC bestimmt, indem 4-Methylumbelliferyl- β -D-cellobiosid enzymatisch gespalten wurde und das freie 4-Methylumbelliferon über den Differenzabsorptionskoeffizienten von 1600 M^{-1} bei 350 nm bestimmt wurde [CHERNOGLAZOV ET AL. 1989].

Prakash stellte einen fluoreszierenden Marker zur Kennzeichnung von Sacchariden her, indem er die Aldehydgruppen von N-Acetylglucosaminen und ihre Di- und Tri-Saccharide mit 7-Amino-4-methylcomarin (AMC) durch reduktive Aminierung in Gegenwart von Natriumcyanborhydrid koppelte. Die sauren und die enzymatischen Hydrolyseprodukte konnten bis zu Konzentrationen von einem picomol Zucker-AMC mittels Dünnschichtchromatographie quantitativ durch Fluoreszenz unter UV-Licht detektiert werden [PRAKASH UND VIJAY 1983].

Herstellung definierter Substrate:

LATTOVA ET AL. [1992] stellte aus Birkenholzxytan durch saure Hydrolyse mit H_2SO_4 und H_2O_2 , Neutralisation durch NaOH, Dialyse und anschließende Ultra- und Gelfiltration Fraktionen mit Molmassen von 7500–8500 her. Die Detektion der einzelnen Fraktionen wurde mit einem Refraktometer durchgeführt. Die Molmassenbestimmung erfolgte über Membranosmose. In der Enzymanalytik wurden die Produkte nicht eingesetzt.

β -Xylobioside wurden durch selective 4-O-Tri-Ethylsilierung von β -Xylopyranosiden mit Zinn-dibutyloxid und Triethylsilylchlorid und anschließender 2,3-Diacetylierung synthetisiert. Disylierung unter sauren Bedingungen ergab die in der 4-Position ungeschützten Xyloside. Diese

wurden dann mit 2,3,4-tri-O-Acetyl- β -D-Xylopyranosyltrichlor-acetamid β -xylolisiert [ZISER UND WITHERS 1994].

Anwendung modifizierter Substrate zur Enzymaktivitätsbestimmung in komplexen Proben: Gill verglich die Bestimmung der β -Glucanaseaktivität in Malz über carboxymethyliertes Gersten- β -Glucan mit kovalentgebundenem RBB [MCCLEARY UND SHAMEER 1987] und über Viskosimetrie [MORGAN ET AL. 1984]. Die Bestimmung über kovalentgebundenes RBB hatte die geringere Varianz (2%). Die viskosimetrische Bestimmungsmethode wies eine Varianz von 10% auf [GILL 1987].

Die Entwicklung von drei Enzymbestimmungsmethoden zur Vorhersage der in-vivo-Antwort auf Enzymzusatz bei Gerstendiäten zur Fütterung an Küken wurde von Rotter beschrieben. Der β -Glucanabbau von einigen Rohpräparaten (reines Enzym) wurde viskosimetrisch, colorimetrisch (mit kommerziellem Azo-Gersten-Glucan) und über reduzierende Zucker bestimmt. Die colorimetrische Bestimmungsmethode erwies sich als Methode der Wahl, weil sie einfach zu handhaben war und kleine Variationskoeffizienten hatte [ROTTER ET AL. 1989].

Enzymaktivitätsbestimmung über Viskositätsabnahme:

Engelen detektierte β -Glucanase und endo-Xylanase Aktivität in Futtermitteln über die Abnahme der Viskosität. Die Aktivität von Natugrain[®], einem β -Glucanasen/endo-Xylanasen enthaltenen Enzympräparat und Lyxasan forte[®], einem Enzympräparat, welches β -Glucan, bzw. Xylan unter bestimmten Bedingungen hydrolysiert, wurde mittels eines Kugelfall-Viskosimeters aus extrahierten Futtermittelproben bestimmt. Als Substrat wurde alkalisch gelöstes und anschließend neutralisierte Haferspелzenxylanlösung bzw. β -Glucan verwendet. Die Dinitrosalicylsäuremethode diente zur Kalibrierung der Enzymaktivität. Die β -Glucan-Aktivität wurde in BGU (1 BGU = 0.278 μ mol freigesetzte Glucoseäquivalente/min), die Xylan-Aktivität in EXU (1 EXU = 3.346 μ mol freigesetzte Glucoseäquivalente/min) angegeben. Die angegebenen Enzymaktivitäten wurden auf Internationale Einheiten umgerechnet. Die untere Bestimmungsgrenze für β -Glucanasen lag bei 17,9 IE/g, für Xylanasen bei 1,49 IE/g [ENGELEN 1996].

Einschätzung des Kenntnisstandes und Schlußfolgerung:

Die referierte Literatur läßt sich in zwei generelle Bestimmungsmethoden aufteilen. In der einen Methode werden Komponenten eingeführt, so daß nach der partiellen Hydrolyse leicht detektierbare Produkte [SATOMURA ET AL 1986] vorliegen. Diese haben eine Molekülgröße von $dp \geq 8$ und sind mit durch NMR (Nuclear Magnetic Resonance) detektierbares Tritium oder Deuterium oder mit Chromophoren wie (Di-)Nitrophenyl und Farbstoffen, die photometrisch bestimmt werden können, markiert. Diese Substrate sind zur Bestimmung von exo-Enzymen, zur Bestim-

mung von endo-Enzymen nur bedingt geeignet, da z.B. die Nitrogruppe nur endständig in das Substratmolekül eingeführt wird. Die Verwendung von Deuterium, Tritium und ^{19}F zur Markierung der Polysaccharide ist für die geplante Anwendung zu teuer. Außerdem wurde die Markierung nur bei kleinen Molekülen verwendet, die zuvor aufwendig synthetisiert wurden. Mit Substraten großer Molmasse und chromogenen Komponenten wurde in den Veröffentlichungen von Biely [1985], McCleary [1987], Enache [1986], Maior [1985], Rescigno [1994] und Wood [1980, 1982, 1985] gearbeitet. In den 4 erstgenannten binden die Farbstoffe kovalent an das Substratmolekül. Wood und Rescigno arbeiten mit ionischen Farbstoffen. Die andere Methode ist die Enzymaktivitätsbestimmung über Viskositätsabnahme. Für die Enzymaktivitätsbestimmung über Viskositätsabnahme verwendet McCleary Arabinoxylan und β -Glucan. Enzymatische Aktivität auf β -Glucan wird in der Vorschrift von Gist-Brocades, den Veröffentlichungen von Gill und Engelen bestimmt. Engelen bestimmte die Aktivität auf Xylan mittels der Viskositätsabnahme, wobei die untere Bestimmungsgrenze der Aktivität auf Xylan (1,5 IE/g) und β -Glucan (17,5 IE/g) nicht besonders empfindlich ist.

Zur Verbesserung der Enzymbestimmung im komplexen Medium kommen die Methoden zur Substratmodifizierung in Frage, wo das Substrat zur Enzymaktivitätsbestimmung auf Xylan bzw. β -Glucan dem Substrat, wie es in der Futtermittelmischung vorkommt, ähnlich bleibt. Also erscheint zur Enzymaktivitätsbestimmung die Verwendung relativ großer Substratmoleküle mit Farbstoffen, die nach der Hydrolyse bestimmt werden können und die Enzymbestimmung über die Abnahme der Viskosität geeignet. Eine Verbesserung der gängigen Methoden (z.B. der Agar-diffusionstest) kann z.B. durch eine Verkleinerung des Substratmoleküls erreicht werden, da es von weniger Enzymmolekülen schneller hydrolysiert wird und dadurch eine empfindlichere Nachweisreaktion bewirkt. Die Herstellung kleiner Moleküle (Xylobioside) wird in der Veröffentlichung von ZISER und WITHERS [1994] beschrieben. Allerdings sind die synthetisierten Moleküle für die Anwendung in der Futtermittelanalytik zu klein ($\text{dp}=2$) und die Methode ist zu zeitintensiv und von den Ausgangsmaterialien zu aufwendig, um die benötigten Mengen für die Enzymbestimmung herzustellen. Vielversprechend erscheint die saure Hydrolyse von Birkenholzxyylan und anschließende Fraktionierung in Fraktionen mit Molmassen von 7500–8500 M [LATTOVA ET AL. 1992]. Allerdings war das Ausgangsmaterial Birkenholzxyylan, welchen durch die Säuregruppen besser wasserlöslich ist und nur eine Molmasse von ca. 160000 M hat. Die Verwendung von Birkenholzxyylan ist nicht üblich, da es dem Substrat im Futtermittel nicht sehr ähnlich ist. Diese Methode sollte deshalb auf Haferspелzenxyylan übertragen werden. Auch eine Löslichkeitsverbesserung z.B. durch Carboxymethylierung (McCLEARY 1995) kann zu einer günstigeren Bioverfügbarkeit und damit Empfindlichkeitssteigerung der vorhandenen Methoden führen.