

5. Ergebnisse

Im folgenden werden die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der Enzympräparate, wie isoelektrischer Punkt, pH-Optimum, Anzahl der aktiven Enzyme innerhalb der verschiedenen Enzympräparate und die Analyse der enzymatischen Hydrolyseprodukte einiger Enzympräparate vorgestellt.

Die Substrate zur Enzymaktivitätsbestimmung wurden physikalisch, chemisch und enzymatisch modifiziert, anschließend charakterisiert und zur Enzymaktivitätsbestimmung in komplexen Proben, wie Futtermittel- und Digestaprobe angewendet.

Die Entwicklung und die Ergebnisse der Anwendung der neuen Enzymaktivitätsbestimmungsmethode „Farbreaktion“ wird dokumentiert.

5.1 Enzymcharakterisierung

5.1.1 Biochemische Charakterisierung

In diesem Ergebnisabschnitt werden von einigen Präparaten die spezifischen Enzymhaupt- und Nebenaktivitäten, die isoelektrischen Punkte und die pH-Optima dargestellt, um sie für weitere Untersuchungen zu charakterisieren und die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmungsmethoden vergleichbar zu machen. Hauptaktivitäten sind die höchsten Aktivitäten innerhalb eines Präparates. Tabelle 4 zeigt am Beispiel des Enzympräparates Biofeed plus® (*Humicola insolens*) die Reinigung von β -Glucanasen.

Tabelle 4: Reinigung von β -Glucanasen am Beispiel des Enzympräparats Biofeed plus® (*Humicola insolens*)

Reinigungsschritt	Gesamtprotein ¹ [mg/ml]	Aktivität ² [IE/ml]	spezifische Aktivität ³ [IE/mg Gesamtprotein]
Rohpräparat	34,0	720	21,2
Ultrafiltration	12,0	690	57,5
Aufkonzentrierung	10,5	650	61,9
Anionenaustauscher	2,5	1540	669,0
Gelfiltration	1,5	1410	881,0

¹Bradford Proteinbestimmung; ²DNSS-Test (Substrat Lichenin); ³Aktivität als Summe der aktiven Komponenten

Nach der Auftrennung war zu erkennen, daß nur ein Anteil von 2,4% des Gesamtproteins enzymatische Aktivität auf das Substrat β -Glucan aufweist (Tab. 4).

Tabelle 5: Enzymaktivitäten verschiedener Enzympräparate in IE/g

Handelsname	Produktionsstamm*	β -Glucanase	Cellulase	Xylanase	Laminarinase
Avizyme 1300®	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>T. viride</i>	52	12	2662	n.b.
Biofeed plus®	<i>Humicola insolens</i>	689	76	1706	3
Biofeed Wheat®	<i>Aspergillus oryzae</i>	36	5	1173	0
Lyxasan®	<i>A. niger I</i>	1379	549	14517	12
Roxazyme®	<i>T. viride</i>	2530	155	12780	136
Barlican®	<i>T. reesei I</i>	16100	123	1790	0
Biopract®	<i>T. reesei II</i>	12820	52	3760	51
Energex®	<i>A. niger II</i>	1370	64	233	10
Novozyme 104®	k. A.	0	–	160	n.b.
Hostazym X®	k. A.	18	–	710	n.b.

DNSS-Test bei 50°C und pH 6,0; als Substrate dienten Lichenin, Laminarin und Haferspelzenxylan, n.b. = nicht bestimmt, *nach Herstellerangaben 1994; k.A.= keine Angabe

Tabelle 5 zeigt die Enzymaktivitäten und –spezifitäten der verschiedenen Enzympräparate bei Verwendung von Haferspelzenxylan, Laminarin, CMC und β -Glucan als Substrat. Sie wurden mittels DNSS-Test ohne Berücksichtigung des jeweiligen pH-Optimums bei 50°C in 20 mM Natriumacetatpuffer einheitlich bei pH 6,0 bestimmt. Die Enzympräparate ließen sich nach ihren Hauptaktivitäten in β -Glucanase betonte Enzyme und Xylanase betonte Enzyme einteilen. Xylanase betonte Präparate sind Avizyme®, Biofeed plus®, Biofeed Wheat®, Lyxasan®, Hostazym X®, Novozyme 104® und Roxazyme®. β -Glucanase betonte Präparate sind Barlican®, Biopract® und Energex®.

In den Nebenaktivitäten zeigten die Enzympräparate erhebliche Unterschiede. Das Enzympräparat Biofeed Wheat®, welches aus einem gentechnisch veränderten Mikroorganismus stammt, hatte keine Nebenaktivitäten im Vergleich zu Präparaten, die mit lediglich selektierten Mikroorganismenstämmen produziert wurden. Die sehr geringen Nebenaktivitäten, die auch im Zymogramm erkennbar sind, sind vernachlässigbar. Alle Präparate hatten eine niedrige Aktivität auf Cellulose und Laminarin.

Tabelle 6: Spezifische β -Glucanaseaktivitäten (IE/mg) der einzelnen Enzympräparate

Enzympräparat	spezifische Aktivität [IE/mg Protein]
<i>Aspergillus niger I</i>	932
<i>Aspergillus niger II</i>	571
<i>Humicola insolens</i>	881
<i>Trichoderma reesei I</i>	437
<i>Trichoderma reesei II</i>	602
<i>Trichoderma viride</i>	124

Die spezifische enzymatische Aktivität der unterschiedlichen Enzymrohpräparate auf Lichenin (Tab. 6) zeigte deutliche Unterschiede. Sowohl die Unterschiede zwischen Enzympräparaten aus verschiedenen mikrobiellen Produktionsstämmen, wie z.B. von 124 IE/mg bei *T. viride* und 932 IE/mg Protein bei *Aspergillus niger*, als auch zwischen Enzympräparaten aus gleichen Produktionsstämmen, wie z.B. *T. reesei I* mit 437 IE/mg Protein und *T. reesei II* mit 602 mg/IE Protein.

Alle untersuchten Enzympräparate zeigten auf Zymogrammen wenigstens zwei β -Glucanase Aktivitäten. Die Abbildung 13 zeigt als Beispiel ein mit Lichenin (β -Glucan) versetztes und mit der Doppelfärbetechnik angefärbtes SDS-Gel. Die hellen Banden zeigen Aktivität auf das Substrat Lichenin, die dunklen Banden sind Proteinbanden ohne enzymatische Aktivität.

Tabelle 7: Molmassen (in kD), Verteilung der aktiven Komponenten und Substratspezifität (Hauptbanden in Fettdruck)

Enzympräparat	Proteinbanden mit Aktivität gegenüber		
	CMC	Xylan	Xylan u. Lichenin
<i>Aspergillus niger I</i>	-100, 65, 62, 57, 48 , 42, 38	56, 42, 38, 37 , 32, 24 , 22	–
<i>Aspergillus niger II</i>	67, 48, 38, 36 , 34 , 28	42, 37 , 26	–
<i>Humicola insolens</i>	- 102 , 92, 82, 80, 64, 56, 42	-98, 90, 84, 72, 62, 39	–
<i>Trichoderma viride</i>	92, 80, 56 , 52 , 50, 20	32, 21	–
<i>Trichoderma reesei I</i>	72, 56 , 54, 32, 20	-102, 56 , 32, 29, 26, 21	–
<i>Trichoderma reesei II</i>	56 , 54, 45, 32, 22	56 , 32, 26, 21	56

In Tabelle 7 sind die Molekulargewichte der aktiven Komponenten und die Substratspezifität der verschiedenen Enzympräparate zusammengestellt. Der Vergleich der Präparate *A. niger I* und *II* ließ erkennen, daß die Enzympräparate unterschiedliche Aktivbanden haben. Die Haupt-

aktivitäten des *A. niger I*-Präparates ließen sich im *A. niger II*-Präparat als schwache Nebenaktivität erkennen (Tab. 7).

In den Zymogrammen der *T. reesei*-Präparate stimmten die Aktivbanden bis auf eine zusätzliche Enzymaktivität mit hoher Molmasse im *T. reesei-II*-Präparat. In den unterschiedlichen Enzympräparaten (Tab. 7) wurden bis zu maximal 11 Banden mit Aktivität auf β -Glucan (*A. niger I*) und bis zu 10 Banden mit Aktivität auf Xylan (*H. insolens*) nachgewiesen. Viele dieser Banden tragen allerdings nur zu einem geringen Teil zur Gesamtaktivität der Enzympräparate bei. Es gibt innerhalb der Enzympräparate Proteinbanden mit enzymatischer Aktivität, die identische Molmassen (56 kD β -Glucanaseaktivität bei den *Trichoderma*-Stämmen und *H. insolens*) und enzymatisch aktive Proteinbanden die unterschiedlicher Molmassen, aber mit gleicher Substratspezifität aufweisen.

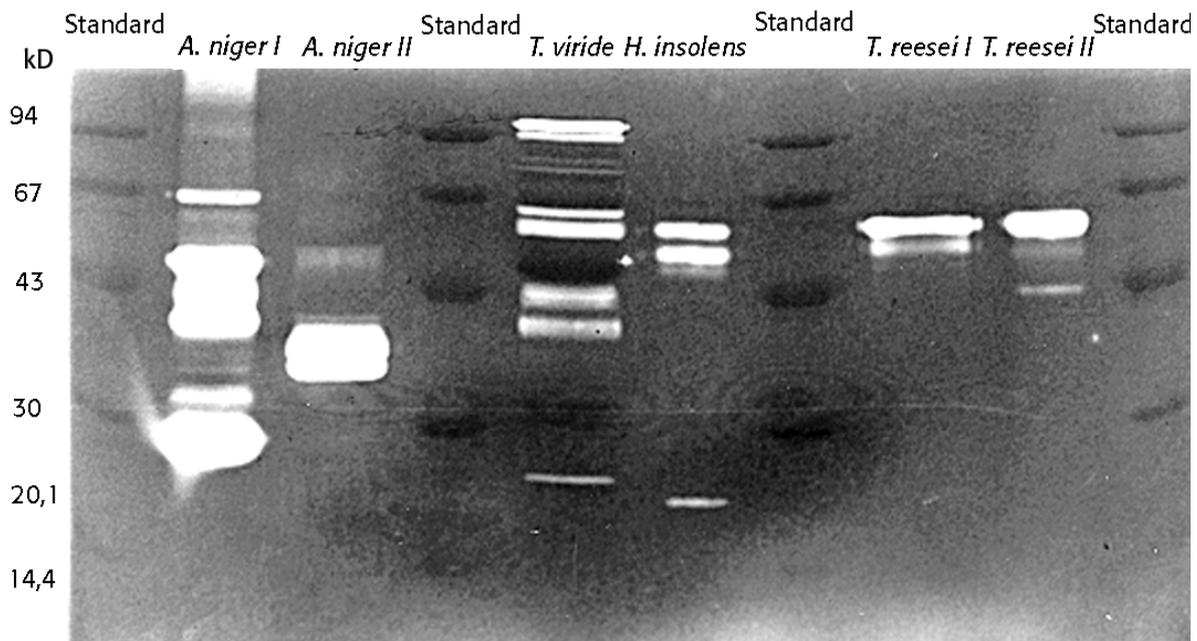


Abbildung 13: Beispiel für ein mit Lichenin (β -Glucan) versetztes und mit der Doppelfärbetechnik angefärbtes SDS-Gel mit 6 Enzympräparaten (Helle Banden = Aktivität auf Substrat Lichenin, dunkle Banden = Proteinbanden ohne enzymatische Aktivität);

Bahn 2: *A. niger I*, 3: *A. niger II*, 5: *H. insolens*, 6: *T. viride*, 8: *T. reesei I*, 9: *T. reesei II*,
Bahnen 1, 4, 7, 10: niedrige Molmassen Standards (Fa. Pharmacia, Schweden)

Tabelle 8: Isoelektrische Punkte und pH-Optima aktiver Komponenten (β -Glucan) ausgesuchter Enzympräparate

Enzympräparat	Molekulargewicht	isoelektrischer Punkt	pH-Optimum
<i>Aspergillus niger I</i>	65	4,2	5,5
	48	5,8	6,5
	38	7,1	6,5
	28	4,5	4,0
<i>Aspergillus niger II</i>	36	4,1	4,5
	34	3,8	4,5
<i>Humicola insolens</i>	102	9,2	4,5
	56	4,3	5,5
	22	8,8	6,5
<i>Trichoderma viride</i>	56	4,3	5,5

In Tabelle 8 sind die isoelektrischen Punkte und die pH-Optima einiger Enzympräparate dargestellt. Der Vergleich der isoelektrischen Punkte zeigt, daß es sich bei den Hauptaktivitäten der verschiedenen Enzympräparate jeweils um unterschiedliche Enzyme handelt. Die pH-Optima der 3 aktiven Komponenten liegen bei *Humicola insolens* zwischen 4,5 und 6,5. *Aspergillus niger I* hat 4 aktive Komponenten mit pH-Optima zwischen 4 und 6,5. Die beiden aktiven Komponenten von *A. niger II* haben das gleiche pH-Optimum bei 4,5. *T. viride* hat eine aktive Komponente mit einem pH-Optimum bei 5,5.

Tabelle 9: Temperaturstabilität (Restaktivität) der Enzympräparate nach 30 min Inkubation bei 60°C in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 bzw. 4,5, bestimmt mittels DNSS-Test

Rohpräparat	Herkunft	Restaktivität [%]		
		Lichenin	CMC	Xylan
Lyxasan®	<i>Aspergillus niger I</i>	64	84	21
Energex®	<i>Aspergillus niger II</i>	67	82	28
Biofeed plus®	<i>Humicola insolens</i>	55	73	45
Roxazyme®	<i>Trichoderma viride</i>	62	44	25
Barlican®	<i>Trichoderma reesei I</i>	73	77	18
Biopract®	<i>Trichoderma reesei II</i>	62	95	30

Die Temperaturstabilitäten der Enzympräparate wurden im wässrigen Medium (20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 bzw. 4,5) bestimmt. Futtermittel werden bei 60–80°C trocken pelletiert. In trockener Hitze haben die Enzyme eine höhere Temperaturstabilität. Die ermittelten Temperaturstabilitäten sind in Tabelle 9 dargestellt.

5.1.2 Hydrolysemuster der verschiedenen Enzympräparate

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung wurde Haferspelzenxylan mit 1 bzw. 100 IE Enzym hydrolysiert, um herauszufinden, ob eine Erhöhung der Enzymkonzentration eine Veränderung in der Verteilung der Hydrolyseprodukte bewirkt. Die Hydrolyseprodukte wurden über eine HPLC mit einer Anionenaustauschsäule (HPLC PA1 Säule, Fa. Dionex, Idstein) durch Hydroxid- und Acetateluenten getrennt und die Hydrolysechromatogramme (Hydrolysemuster) mittels amperometrischer Detektion aufgezeichnet. Die Peakgröße ist nur innerhalb eines Empfindlichkeitsbereichs zu vergleichen, weil die Empfindlichkeit des amperometrischen Detektors in den ersten 15 Minuten auf 5 μC , danach auf 1 μC und nach 20 min auf 500 nC eingestellt war. Als Referenzsubstanz zur Identifizierung der enzymatischen Hydrolyseprodukte diente sauer teilhydrolysiertes Haferspelzenxylan (30 min, 2 M H_2SO_4 , Raumtemperatur), wobei die Monomere durch Standards (10 mg/l Xylose, Glucose und Arabinose, Fa. Sigma) identifiziert wurden. Die höherpolymerisierten Xylosen wurden ausgehend von Xylose durch auszählen identifiziert.

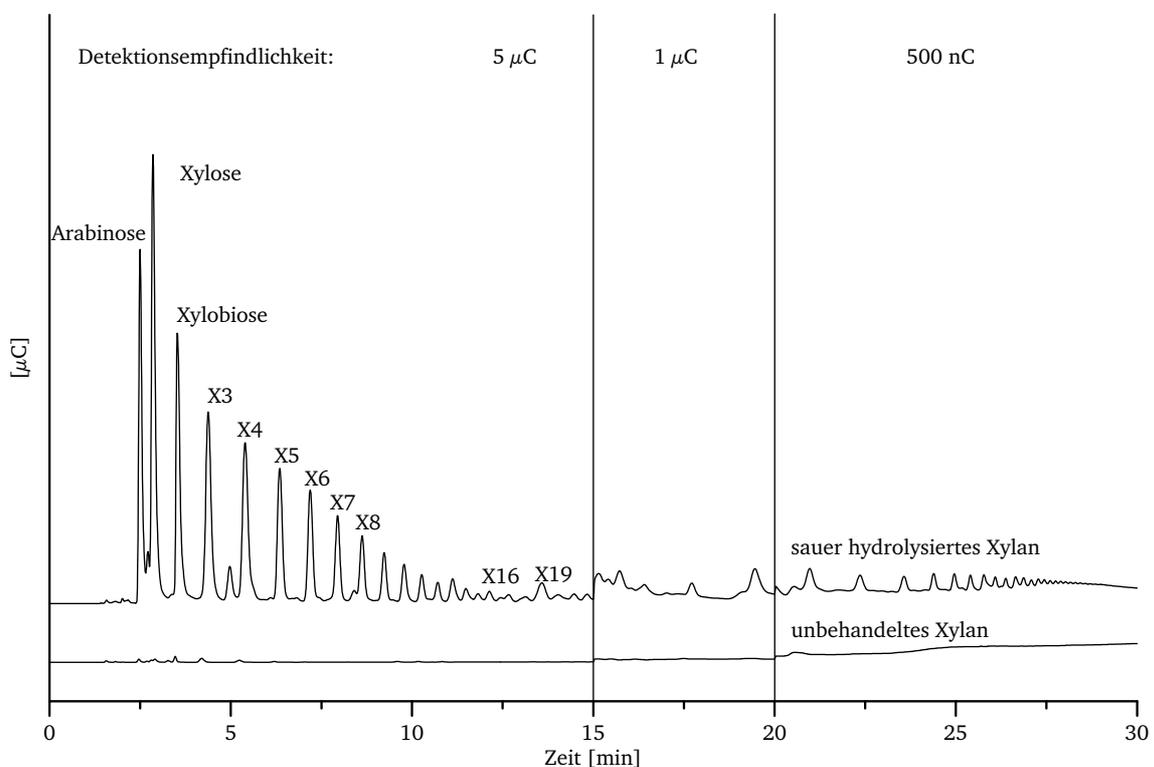


Abbildung 14: Chromatogramm der Referenzsubstanz (30 min mit 2 M H_2SO_4 bei Raumtemperatur hydrolysiertes Haferspelzenxylan) und von unbehandeltem Haferspelzenxylan

Abbildung 14 zeigt das Hydrolysechromatogramm der Referenzsubstanz. Es sind alle Hydrolyseprodukte bis dp 40 vorhanden. Überwiegend wurde das Haferspelzenxylan in Arabinose, Xylose, Xylobiose und Oligomere bis zu einem dp von 19 sauer hydrolysiert; höhere Xyloseoligomere ab dp 19 entstanden in geringeren Konzentrationen. Unhydrolysiertes Haferspelzenxylan hat eine so große Molmasse, daß es nicht eluiert werden konnte (Abb. 14). Durch die enzymatische Hydrolyse entstanden unterschiedliche Hydrolysemuster. Die Chromatogramme konnten nur für qualitative Aussagen verwendet werden, da die amperometrische Detektion auf die einzelnen Hydrolyseprodukte unterschiedlich empfindlich reagiert. Deshalb konnte über die Peakhöhe bzw. Fläche nur halbquantitativ auf die Konzentration der Produkte geschlossen werden. Die folgenden Chromatogramme zeigen die Hydrolyseprofile verschiedener Enzympräparate und –konzentrationen (1 IE/ml und 100 IE/ml).

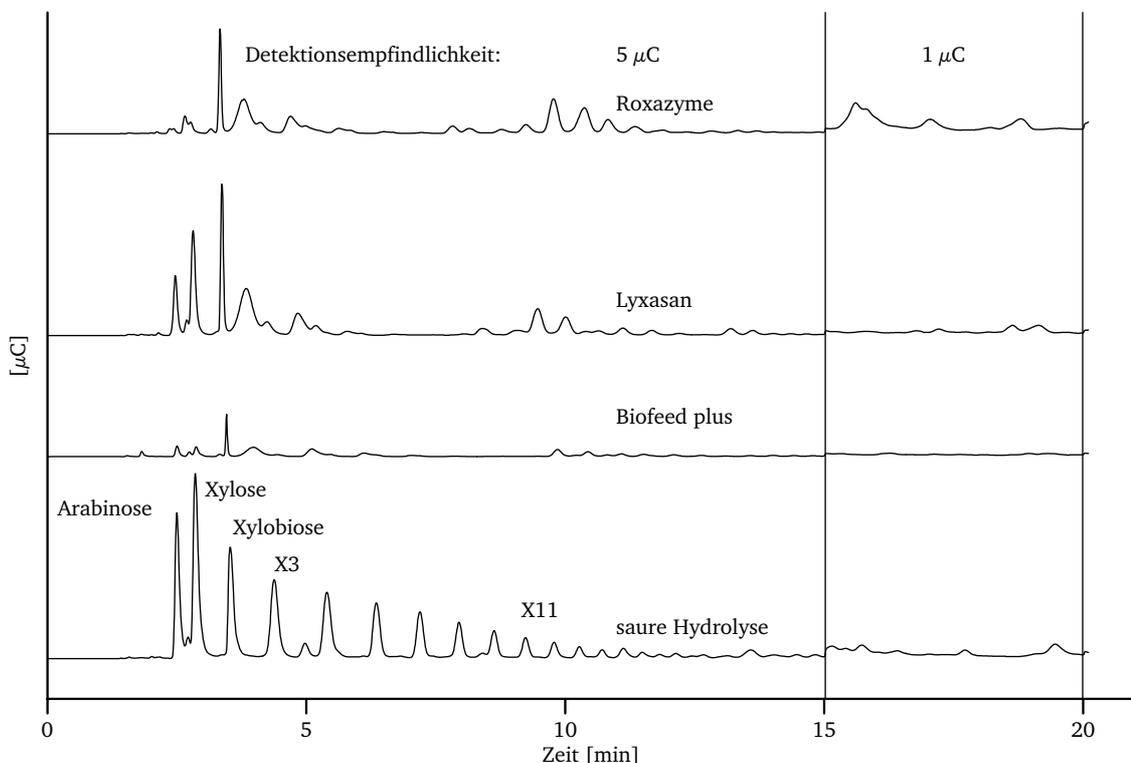


Abbildung 15: Hydrolyseprofile von enzymatisch hydrolysiertem unbehandeltem Haferspelzenxylan. Die Enzymkonzentration der Präparate Roxazyme®, Lyxasan®, Biofeed plus® betrug jeweils 1 IE/ml. Es wurde eine 1%ige Xylanlösung 16–18 h bei RT in Natriumacetatpuffer bei pH 5,4 hydrolysiert.

Durch die Hydrolyse mit Lyxasan® (*A. niger* I) entstand die höchste Konzentration an niedermolekularen Endprodukten: Arabinose, Xylose, Xylobiose, Xylostrimer, Xylosetetramer. Mit Roxazyme® (*T. viride*) entstand in geringer Konzentration als beim Lyxasan® Arabinose, Xylobiose, Xylostrimer und das Pentamer. Die Produkte mit dem Polymerisationsgrad (dp) 11 bzw. 12 waren nach der Hydrolyse mit Roxazyme® in etwas höherer Konzentration vorhanden als nach

der Hydrolyse mit Lyxasan®. Bei der Hydrolyse mit Biofeed plus® (*H. insolens*) entstand überwiegend Xylobiose und sehr geringe Mengen von Arabinose, Xylose, Xylosetrimer (Abb. 15).

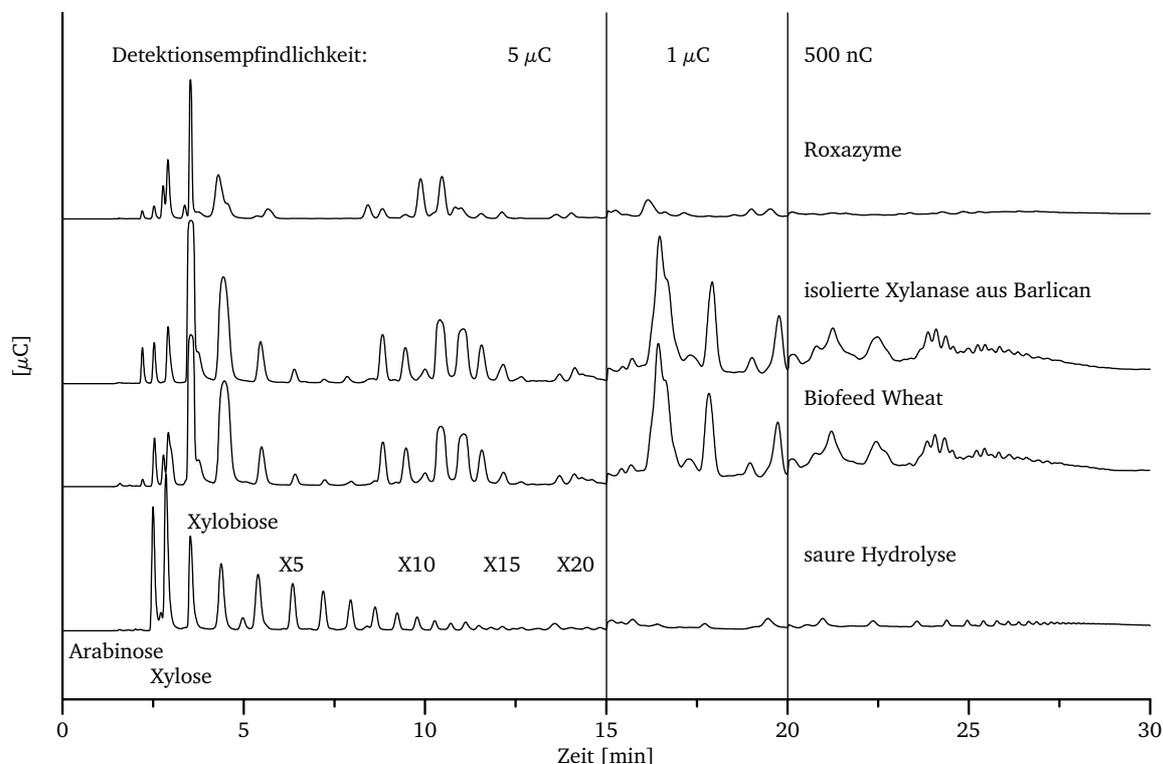


Abbildung 16: Hydrolyseprofile von enzymatisch hydrolysiertem unbehandeltem Haferspelzenxylan. Eine 1%ige Xylanlösung wurde mit 100 IE/ml Biofeed Wheat®, Roxazyme® und der isolierten Xylanase aus Barlican® 16–18 h bei RT in Natriumacetatpuffer bei pH 5,4 hydrolysiert.

Die Hydrolysemuster der isolierten Xylanase aus Barlican® (*T. reesei I*) und Biofeed Wheat® (*A. oryzae*) waren fast identisch. Als deutlicher Unterschied ist zu erkennen, daß Biofeed Wheat® mehr Arabinose freisetzt als die aus Barlican® isolierte Xylanase. In beiden Hydrolyseprofilen lagen hohe Konzentrationen der niedermolekularen Hydrolyseprodukte wie Arabinose, Xylose, Xylobiose, Xylotriose, Xylopentose, gefolgt von geringeren Konzentrationen mit einem Polymerisationsgrad von 6, 7 und 8 vor. Höhere Konzentrationen mit einem Polymerisationsgrad von 9, 10, 12, 13, 14, 16–22 waren zu erkennen (Abb. 16).

Hostazym X® (*k.A.*) (Abb. 17) hydrolysierte zu den üblichen niedermolekularen Endprodukten (Arabinose, Xylose, Xylobiose, etc.). Nach dem Xylohexamer fehlten die Hydrolyseprodukte bis zum Octamer. Danach waren alle Stufen bis zum Polymerisationsgrad (dp) 15 vorhanden. Die Konzentrationen der Hydrolyseprodukte mit einem Polymerisationsgrad (dp) von 16 bis 21 waren geringer, als die mit einem dp von 8–15, die Konzentrationen mit einem dp ab 21 u. 23 waren wieder höher.

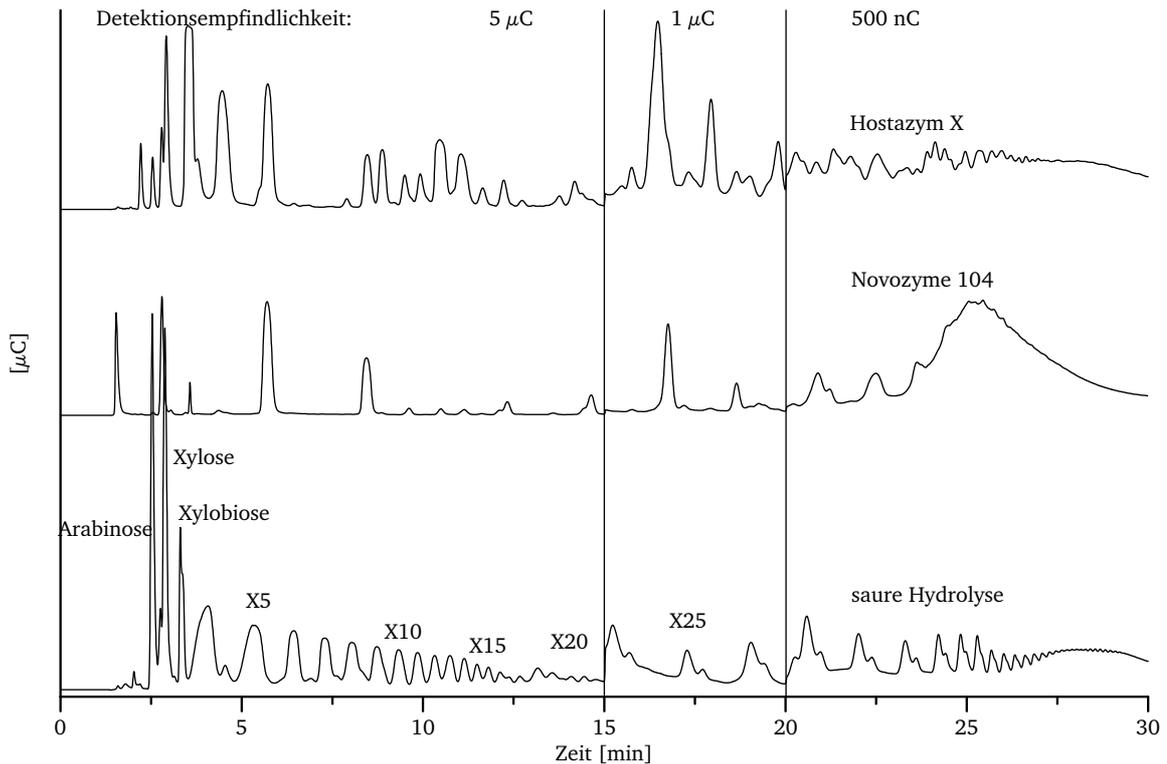


Abbildung 17: Hydrolyseprofile von enzymatisch hydrolysiertem unbehandeltem Haferspelzenxylan. Eine 1%ige Xylanlösung wurde mit je 100 IE Hostazym X[®] und Novozyme 104[®] 16–18 h bei RT in Natriumacetatpuffer bei pH 5,4 hydrolysiert.

Novozyme 104[®] (k.A.) (Abb. 17) hydrolysierte zu Arabinose, Xylose und etwas Xylobiose, das Xylotrimer fehlt. Die Konzentrationen dieser Hydrolyseprodukte waren wesentlich geringer als die Konzentrationen der entsprechenden Produkte, die durch Hydrolyse mit Hostazym X[®] entstanden. Xylosepentamer entstand ungefähr in der gleichen Konzentration wie bei der Hydrolyse mit Hostazym X[®]. Vom Pentamer bis zum Xylononamer fehlten die Hydrolyseprodukte. Die nächste höhere Konzentration hatte einen dp von 21. Nach diesem Produkt kamen mehrere kleinere Konzentrationen bis zum dp 40. Ab dp 40 war ein hohes Maximum von unaufgelösten Peaks zu erkennen.

Durch die Hydrolyse mit Lyxasan[®] (*A. niger* I) und Biofeed plus[®] entstanden überwiegend niedermolekulare Produkte bis zum Tetramer bzw. Pentamer des Xylans. Größere Hydrolyseprodukte traten in geringerer Konzentration auf (Abb. 18). Die Hydrolysemuster der Endprodukte, die jeweils nach 16–18 h entstanden, waren von der Enzymkonzentration unabhängig, wie durch die Hydrolysemuster, die mit Lyxasan[®] und Biofeed plus[®] mit 1 und 100 IE innerhalb der gleichen Hydrolysezeit erzeugt wurden, gezeigt wurde (Abb. 15 und 18).

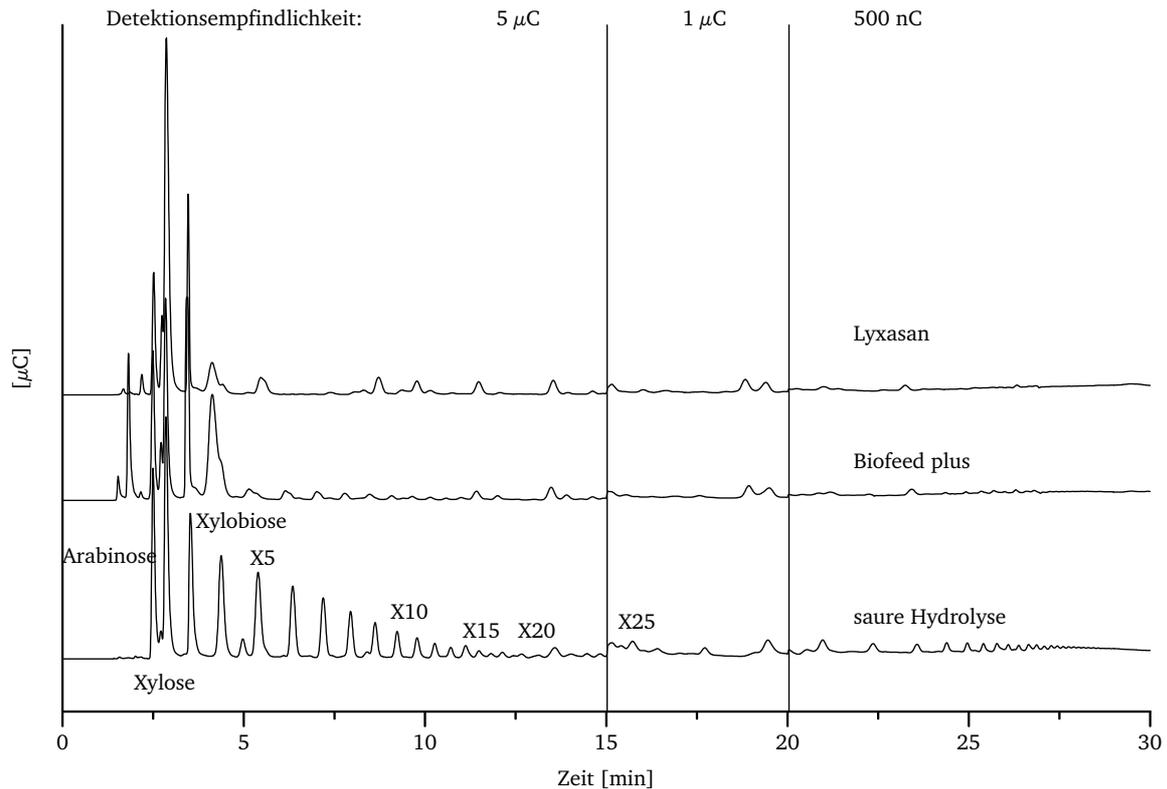


Abbildung 18: Hydrolyseprofile von enzymatisch hydrolysiertem unbehandeltem Haferspelzenxylan. Eine 1%ige Xylanlösung wurde mit je 100 IE Biofeed plus® und Lyxasan® 16–18 h bei RT in Natriumacetatpuffer bei pH 5,4 hydrolysiert.

Nach den Hydrolyseuntersuchungen lassen sich drei ähnliche Gruppen von Hydrolyseproduktmustern erkennen. Ein nahezu vollständiger Abbau des Haferspelzenxylans zu Xylose und Xylobiose lag bei dem *A. niger I* und den *H. insolens* Präparaten vor, wobei die Endprodukte von *H. insolens* mehr Xylotriosen aufwiesen. Etwas unvollständiger war der Abbau durch das *T. viride* Präparat mit großen Anteilen an Oligoxylosen (dp 8–12) und geringeren Anteilen an Polymerxylosen (dp > 30). Als drittes Muster lassen sich die Endprodukte der Enzymreaktion mit *T. reesei II*, *T. longibrachiatum*, *A. oryzae* Präparate und der gereinigten Xylanase aus *T. reesei I* zusammenfassen. Außerdem wurde gezeigt, daß die Hydrolysechromatogramme von der eingesetzten Enzymkonzentration unabhängig sind.

5.2 Enzymaktivitätsbestimmung in komplexen Medien

5.2.1 Agardiffusionstest

Die Enzympräparate wurden in Natriumacetatpuffer, Getreide-, Futtermittel- oder Digestaextrakten verdünnt und in steigender Konzentration in die Bohrungen der substrathaltigen Agarplatten pipettiert. Als Substrate wurden Haferspelzen- bzw. Arabinoxylan, β -Glucan bzw. Lichenin (ein β -Glucan) verwendet. Die durch die Enzymaktivität nach der Inkubation entstehenden Lysezonen können nach der Anfärbung mit Kongorot quantitativ ausgewertet werden. Von

den getesteten Farbstoffen (Trypanblau, Brilliant Yellow, Calcufluor, Kongorot) ist nur Kongorot zur Unterscheidung von hydrolysiertem/unhydrolysiertem Xylan geeignet. Die Auswertung erfolgte anfangs visuell mittels eines Lineals. Der Durchmesser der Lysezonen wurde gegen den Logarithmus der Enzymkonzentration aufgetragen. Diese visuelle Auswertung erwies sich als unpräzise in Bezug auf die logarithmische Korrelation der Enzymkonzentration zu den Lysezonen. Geringe Abweichungen wie z.B. 0,5 mm Differenz bei der Bestimmung der Lysezonen-durchmesser führten zu Fehlern in der Enzymaktivitätsbestimmung, die von der Steigung der Standardkurve abhängt. Eine größere Genauigkeit wurde durch digitale Photographie der Agarplatten und anschließender Auswertung mittels Densitometriesoftware erzielt (Fa. Raytest, Straubenhardt). Die Fläche der Lysezonen wurde gegen den Logarithmus der Enzymkonzentration aufgetragen. Wenn nichts anderes angegeben, erfolgte die Auswertung mit dem Photodokumentationssystem.

5.2.1.1 Xylanase-Aktivitätsbestimmung

Im folgenden wird die Enzymaktivität einiger Enzympräparate auf das Substrat Xylan und der Einfluß verschiedener Substratmodifikationen auf die Bestimmung der Enzymaktivität im Futtermittel dargestellt. Durch enzymatische Hydrolyse entstanden je nach verwendeter Haferspelzenxylancharge beim Agardiffusionstest unter gleichen Bedingungen (Enzymkonzentration, Temperatur, Inkubationszeit, etc.) Lysezonen unterschiedlicher Größe (ohne Abb.). Die Hydrolyse des Substrats hängt also von der Charge des zur Enzymbestimmung eingesetzten Haferspelzenxylans ab. Als Charge wurde in dieser Arbeit eine Lieferung mit gleicher Chargennummer definiert (s. Tabelle 51, Produktspezifikation Fa. Roth, Karlsruhe, im Anhang). Die Ergebnisse der einzelnen Agardiffusionstests wurden unter Verwendung von Substratmodifikationen aus einer Charge Haferspelzenxylan verglichen. In den Abbildungen wurde die Y-Achse jeweils den unterschiedlich empfindlichen Substraten angepaßt.

Abbildung 19 zeigt die Aktivitätsbestimmung von Xylanasen in verschiedenen Futtermittel-extrakten mittels Agardiffusion. Als Substrat wurde unbehandeltes Haferspelzenxylan verwendet. Die Enzymaktivitätsbestimmung in Roggen und Triticale Futtermitteln wurde stärker gestört, als in Weizen und Gerste. Der Empfindlichkeitsbereich lag zwischen 2,5–25 mm². Der Meßbereich lag zwischen 0,5–1 IE/ml.

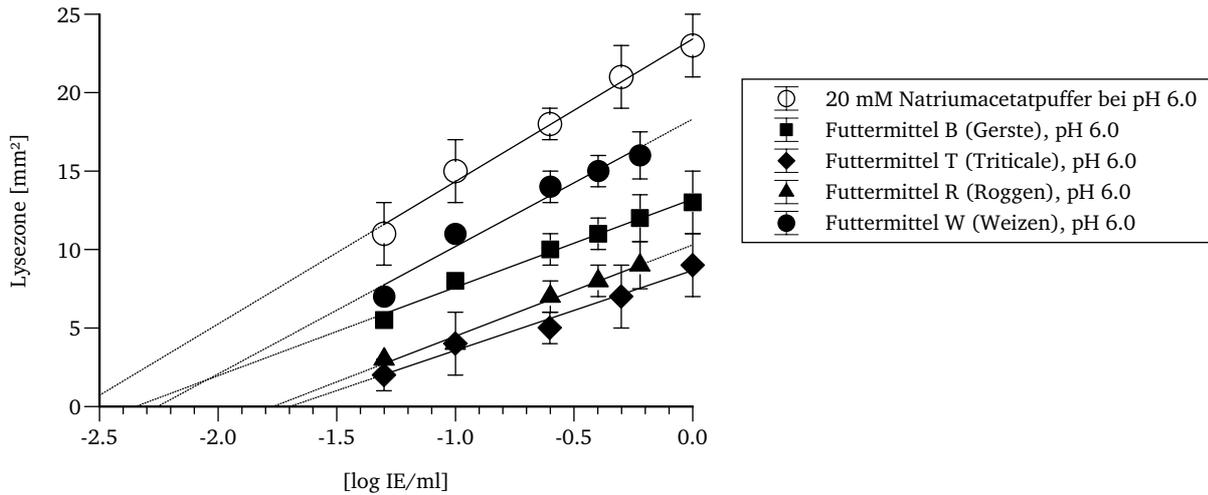


Abbildung 19: Einfluß von verschiedenen Futtermittlextrakten auf die Enzymaktivitätsbestimmung von Enzympräparat Biofeed plus® (*H. insolens*) per Agardiffusion mit unbehandeltem Haferspelzenxylylan als Substrat, veröffentlicht in VAHJEN ET AL. (1997)

Enzymaktivitätsbestimmung in Digestaprobe konnte mit Digesta supplementierten Standardkurven durchgeführt werden. Magendigesta beeinflusste die Enzymaktivitätsbestimmung am stärksten. Der Einfluß der Digestaflüssigkeit auf die Enzymbestimmung verringerte sich bis zum Dünndarmabschnitt 3. Das zeigte sich in größeren Lysezonen (Abb. 20). Der Empfindlichkeitsbereich lag in Dünndarmabschnitt 3 zwischen 5–15 mm², der Meßbereich zwischen 0,1–1 IE/ml. Im Magen- und Dünndarmabschnitt 1 bzw. 3 lag der Empfindlichkeitsbereich zwischen 5–15 mm², der Meßbereich zwischen 0,1–1 IE/ml.

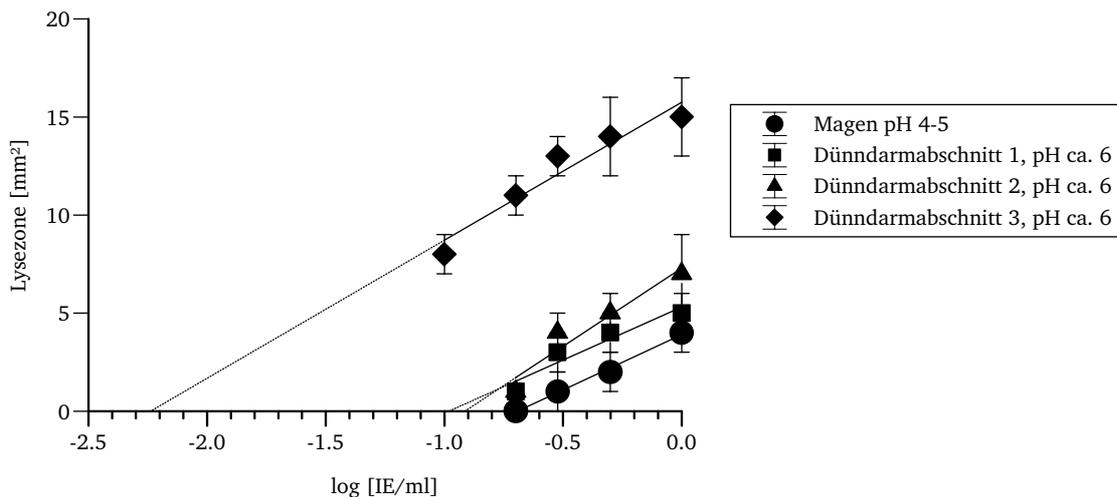


Abbildung 20: Einfluß von Ferkeldigestaüberständen auf die Enzymaktivitätsbestimmung von Enzympräparat Biofeed plus® (*H. insolens*) mittels Agardiffusionstest mit unbehandeltem Haferspelzenxylylan als Substrat, veröffentlicht in VAHJEN ET AL. 1997

Das Haferspelzenxylan wurde, wie beschrieben ultraschallbehandelt und als Substrat im Agardiffusionstest eingesetzt. Die Lysezonen (Abb. 21a), die bei der Verwendung von unbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat entstanden, zeigten noch dunkle (angefärbte) Bereiche, d.h. die Hydrolyse war nicht so vollständig wie bei ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan (21b). Die Lysezonen waren klarer abgegrenzt und damit besser auswertbar.

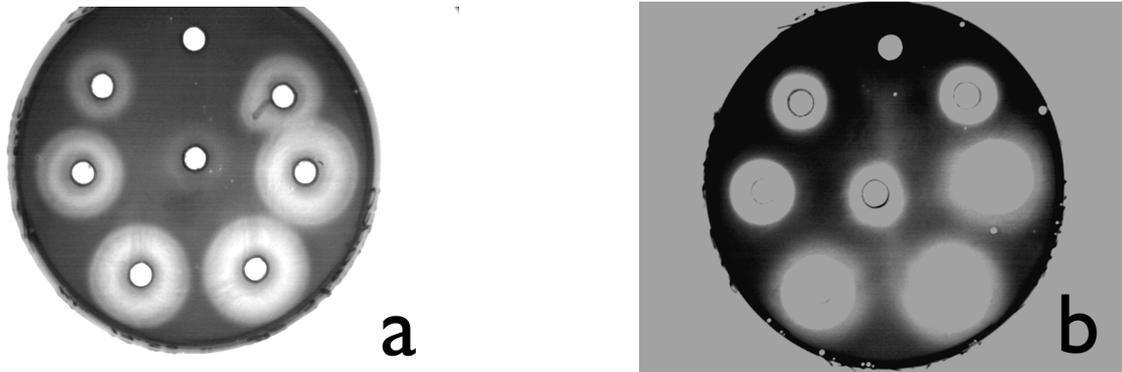


Abbildung 21: a) Agardiffusionstest mit unbehandeltem Xylan, b) Ultraschallxylan, veröffentlicht in VAHJEN ET AL. 1997

Die Ergebnisse, die unter Verwendung des ultraschallbehandelten Xylans erzielt wurden, waren je nach Aufarbeitung Xylans unterschiedlich. Wurde das ultraschallbehandelte Xylan mit Ethanol bzw. Isopropanol ausgefällt und anschließend gefrier- oder luftgetrocknet, so entstanden kleinere Lysezonen mit dem ungefallten (Abb. 21, 22) und direkt aus dem Überstand der Zentrifugation als Substrat verwendeten Xylan. Auch die Steigungen (Tab. 10) zeigen, daß das ultraschallbehandelte Haferspelzenxylan am schnellsten hydrolysiert wird. Deshalb wurde für alle weiteren Enzymaktivitätsbestimmungen das ultraschallbehandelte Haferspelzenxylan nach vorheriger Konzentrationsbestimmung über Trockensubstanz (TS) entsprechend verdünnt und direkt aus dem Überstand eingesetzt.

Tabelle 10: Steigungen der Kalibrationsgeraden, verschiedene Haferspelzenxylanmodifikationen, Enzympräparat Lyxasan® in 20 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0

Haferspelzenxylan	Steigung
unbehandelt	40,3
ultraschallbehandelt, ethanolisch gefällt	45,7
ultraschallbehandelt, ungefällt	56,7

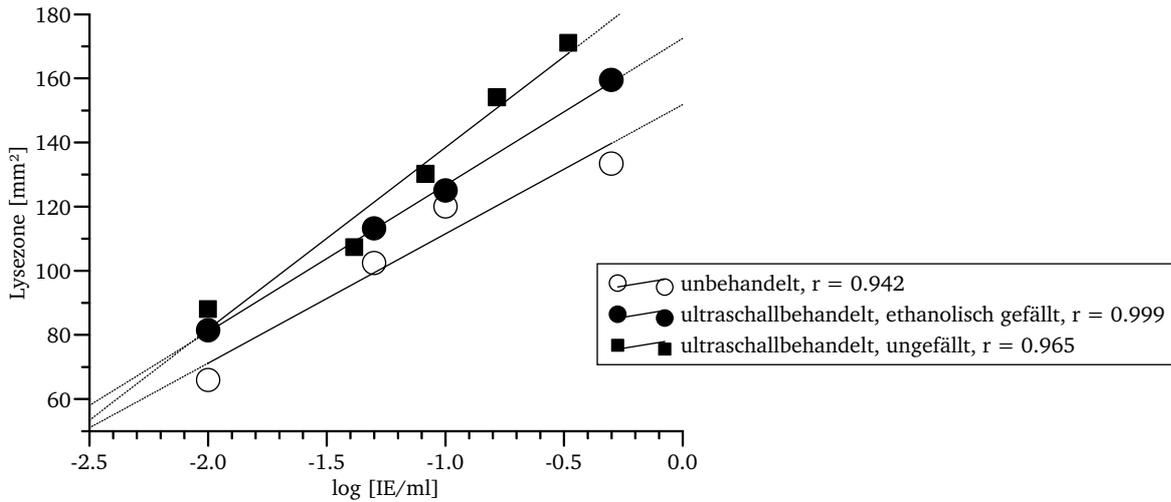


Abbildung 22: Agardiffusionstest mit ethanolisch gefälltem ultraschallbehandeltem, ungefälltem ultraschallbehandeltem und unbehandeltem Haferspелzenxylan, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

Zum Vergleich wurde Arabinoxylan (Megazyme, Irland) als Substrat unter den gleichen Bedingungen wie ultraschallbehandeltes und unbehandeltes Haferspелzenxylan zur Enzymaktivitätsbestimmung der Präparate Lyxasan® (*A. niger I*) und Barlican® (*T. reesei I*) in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0, Futtermittel A- und Weizenextrakt bei pH 6,0 eingesetzt.

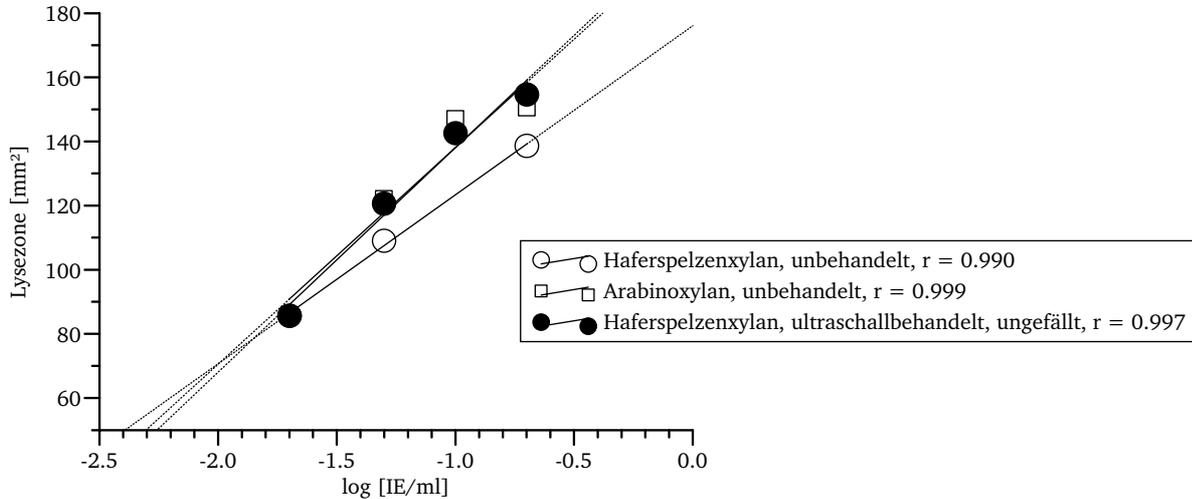


Abbildung 23: Agardiffusionstest mit unbehandeltem, ultraschallbehandeltem Haferspелzenxylan und Arabinoxylan, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

Die Lysezonen, die unter Verwendung von Arabinoxylan als Substrat entstanden, hatten im Agardiffusionstest mit Enzympräparat Lyxasan® (Abb. 23) und Barlican® (ohne Abb.) in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 annähernd die Größe wie die, die unter Verwendung von ultraschallbehandeltem Haferspелzenxylan als Substrat entstanden. Die Steigungen der Geraden waren fast gleich. Die Lysezonen, die bei der Hydrolyse von unbehandeltem Haferspелzenxylan entstanden waren bei höheren Enzymkonzentration etwas kleiner und die Steigung der Geraden

war flacher als bei Verwendung von ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan und Arabinoxylan als Substrat.

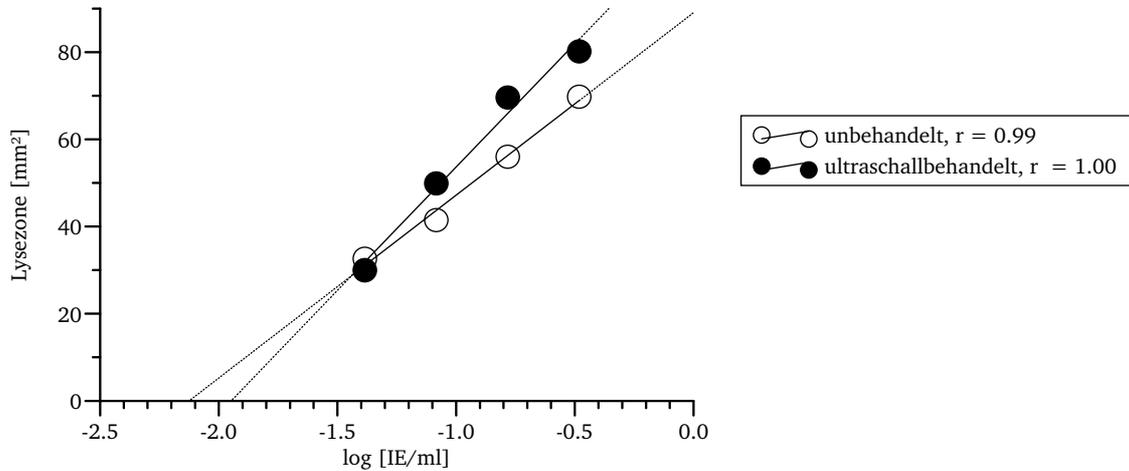


Abbildung 24: Agardiffusionstest mit unbehandeltem und ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan, Enzympräparat Barlican® (*T. reesei I*) in Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0

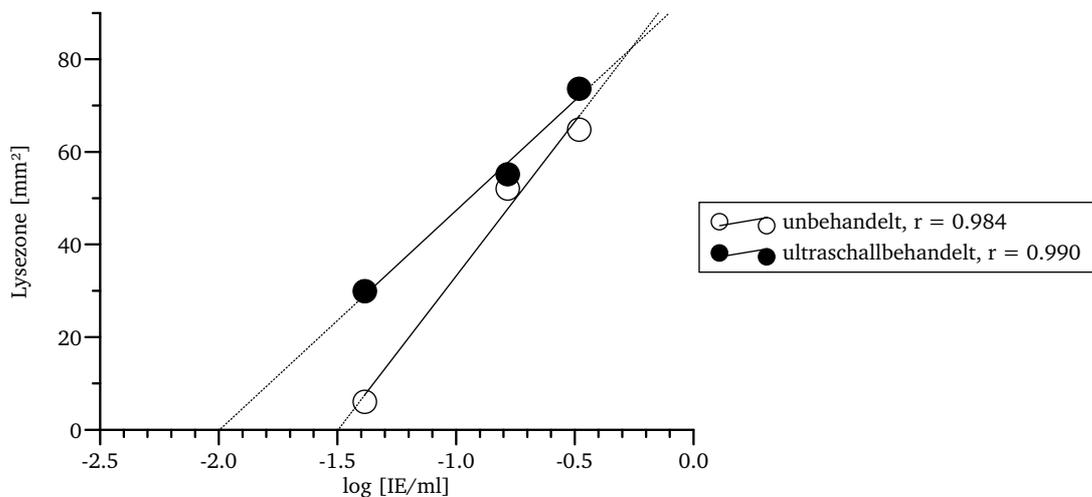


Abbildung 25: Agardiffusionstest mit unbehandeltem und ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan, Enzympräparat Barlican® (*T. reesei I*) in Weizenextrakt bei pH 6,0

Enzymaktivitätsbestimmungen von Barlican® (*T. reesei I*) im Futtermittel- (Abb. 24), Futtermittel G (ohne Abbildung) und im Weizenextrakt (Abb. 25), alles bei pH 6,0, führten unter Verwendung von ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat zu größeren Lysezonen als mit unbehandeltem Haferspelzenxylan. Bei der Enzymaktivitätsbestimmung von Enzympräparat Barlican® und Lyxasan® mit unbehandeltem Arabinoxylan als Substrat in Futtermittel-extrakten bei pH 6,0 (A: Ferkelaufzucht, Hauptkomponenten Weizen, Gerste, Sojaextraktionsschrot, und G: Geflügelmast, Hauptkomponenten Weizen, Mais, Sojaextraktionsschrot;

s. Tab. 3), war jeweils nur eine Lysezone bei hoher Enzymkonzentration (0,5 IE/ml bzw. 1 IE/ml) zu erkennen (ohne Abbildung).

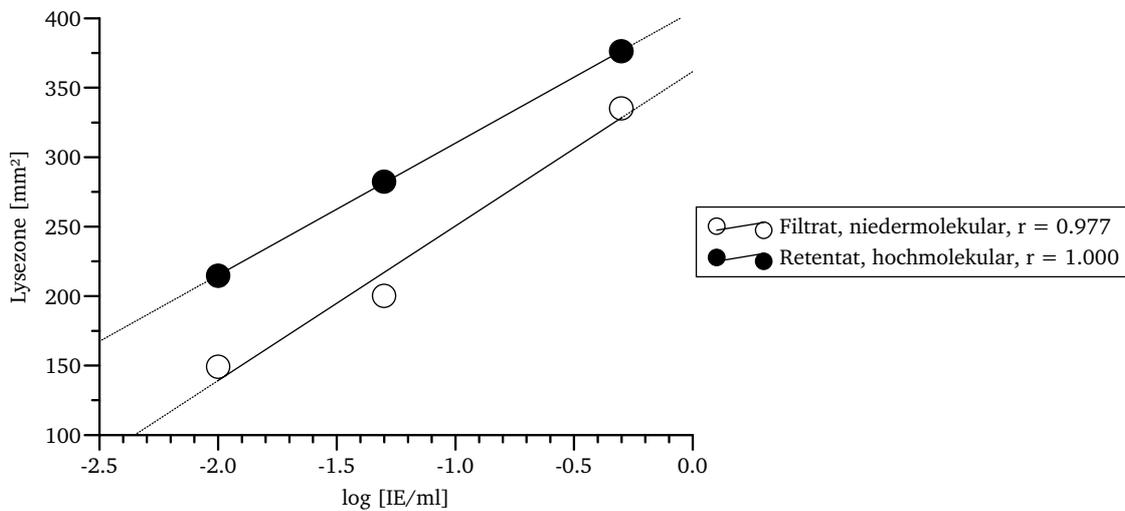


Abbildung 26: Agardiffusionstest mit ultraschallbehandeltem und durch Filtration fraktioniertem Haferspelenxyylan, Enzympräparat Barlican® (*T. reesei I*) in Natriumacetatpuffer pH 6,0

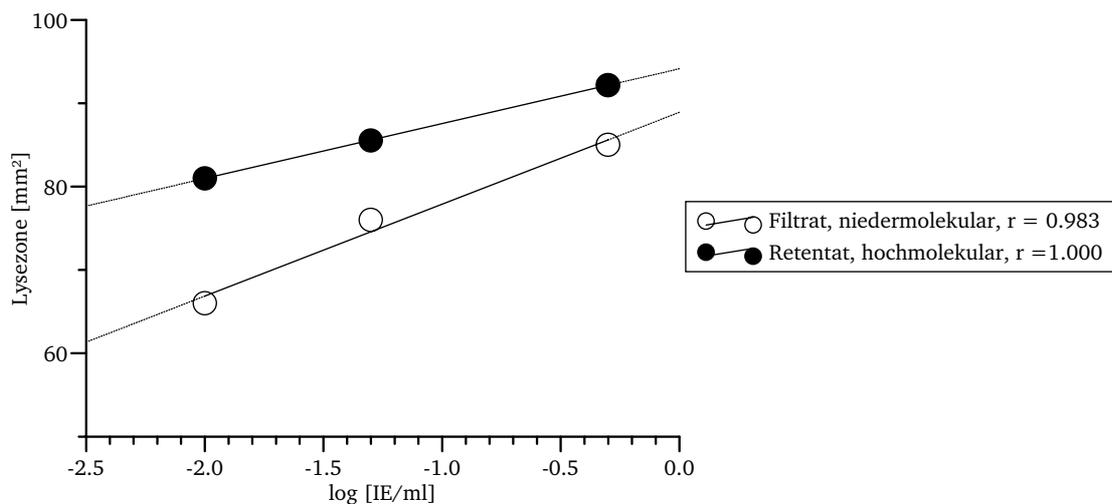


Abbildung 27: Agardiffusionstest mit ultraschallbehandeltem und durch Filtration fraktioniertem Haferspelenxyylan, Enzympräparat Barlican® (*T. reesei I*) im Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0

Das ultraschallbehandelte Haferspelenxyylan wurde durch Filtration mit Proteinfiltren fraktioniert. Es entstanden zwei Fraktionen: eine hochmolekulare Fraktion (passierte nicht den 300 kD-Proteinfilter) und eine niedermolekulare Fraktion (passiert den 5 kD-Proteinfilter). Beide Fraktionen wurden als Substrat im Agardiffusionstest verwendet. Mit Enzympräparat Barlican® in Natriumacetatpuffer (Abb. 26), im Futtermittel A- (Abb. 27) und G-Extrakt (ohne Abb.), (alles bei pH 6,0) entstanden bei Verwendung des Retentats als Substrat größere Lysezonen als bei Verwendung des Filtrats. Die Lysezonen waren bei der Enzymaktivitätsbestim-

mung im 20 mM Natriumacetatpuffer 2,5–3 mal größer als die bei der Aktivitätsbestimmung in den Futtermittlextrakten A und G.

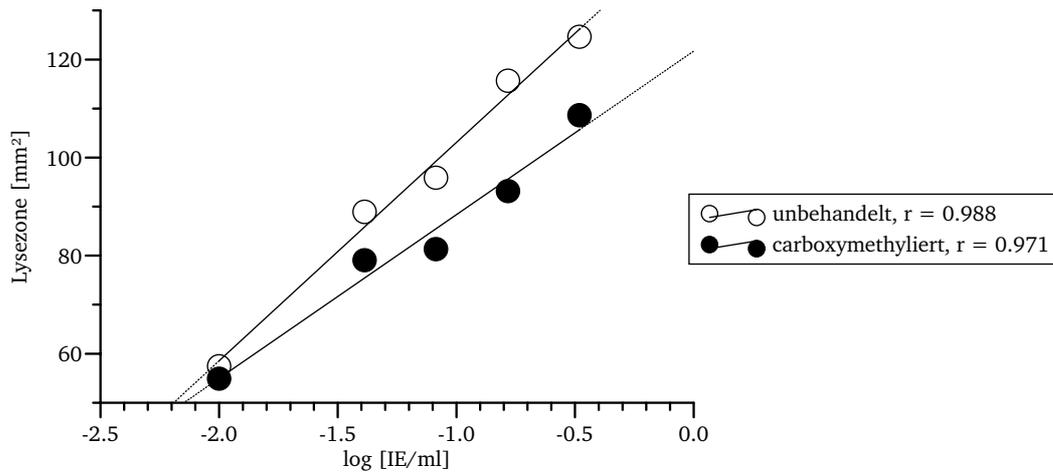


Abbildung 28: Agardiffusionstest mit unbehandeltem und carboxymethyliertem Haferspelzenxylan, Enzympräparat Barlican® (*T. reesei I*) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

Haferspelzenxylan wurde carboxymethyliert und als Substrat zur Aktivitätsbestimmung von Enzympräparat Barlican® in Natriumacetatpuffer verwendet. Als Vergleichssubstrat wurde entsprechendes unbehandeltes Haferspelzenxylan unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Die Lysezonen waren bei carboxymethyliertem Haferspelzenxylan als Substrat kleiner und die Steigung der Geraden war flacher als bei Verwendung von unbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat (Abb. 28). Die Korrelation war beim carboxymethyliertem Haferspelzenxylan schlechter als bei der Verwendung von unbehandeltem Haferspelzenxylan. Acetyliertes Haferspelzenxylan führte zu einem ähnlichen Ergebnis (ohne Abb.).

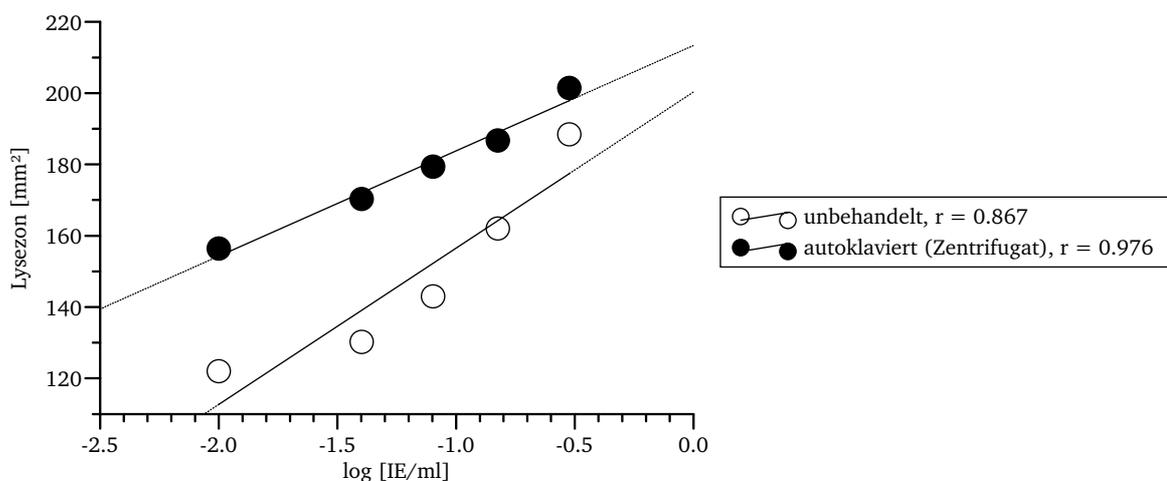


Abbildung 29: Agardiffusionstest mit unbehandeltem und dem Zentrifugat des autoklavierten Haferspelzenxylans, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

Einfaches Autoklavieren und anschließendes Zentrifugieren von Haferspelzenxylan führte zu zwei Phasen (Überstand und Zentrifugat). Mit dem Zentrifugat als Substrat wurden im Vergleich zu unbehandeltem Haferspelzenxylan mit den Enzympräparaten Barlican® (ohne Abb.) und Lyxasan® (Abb. 29) in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 größere Lysezonen erhalten.

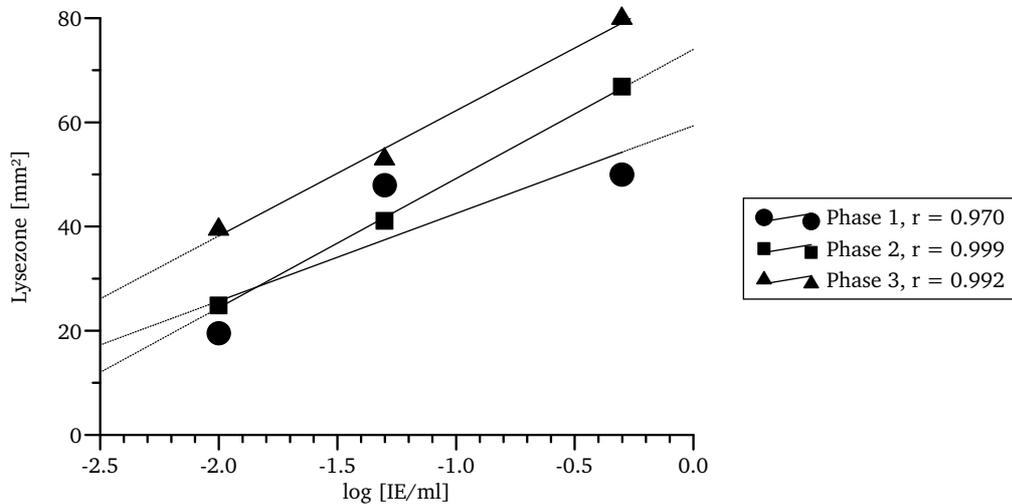


Abbildung 30: Agardiffusionstest mit mehrfach autoklaviertem und durch Zentrifugation getrennten Haferspelzenxylan als Substrat, Enzympräparat Barlican® (*T. reesei D*) in Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0

Mehrfaches Autoklavieren und anschließendes Zentrifugieren führte zu 3 Phasen. Als Substrat im Agardiffusionstest entstanden bei Verwendung der untersten Phase (P3) größere Lysezonen mit Enzympräparat Barlican® in Natriumacetatpuffer (ohne Abb.) und in Futtermittel A-Extrakt (Abb. 30) (beide bei pH 6,0) als mit den beiden oberen Phasen (P1 u. P2).

Mit Enzympräparat Barlican® im Weizenextrakt bei pH 6,0 (ohne Abb.) waren die Lysezonen, die mit dem Zentrifugat des autoklavierten Haferspelzenxylans erhalten wurden bei kleineren Enzymkonzentration größer als die, die mit unbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat unter den gleichen Bedingungen erhalten wurden. Bei höheren Enzymkonzentration hatten die Lysezonen bei beiden Substraten annähernd die gleiche Größe. Die Aktivitätsbestimmung von Enzympräparat Barlican® im Haferextrakt bei pH 6,0 führte bei der Verwendung des Zentrifugats von autoklaviertem Haferspelzenxylan mit hohen und mit niedrigen Enzymkonzentrationen zu größeren Lysezonen (ohne Abb.) als mit unbehandeltem Haferspelzenxylan.

Haferspelzenxylan wurde enzymatisch hydrolysiert und durch Filtration in Filtrat und Retentat fraktioniert. Die Hydrolyse wurde 15 min mit anschließender Fraktionierung bzw. kontinuierlich mit gleichzeitiger Fraktionierung in einer Ultrafiltrationsrührzelle durchgeführt. Als Substrate wurden Filtrat, Retentat und die Gesamtfraktion (unfiltriertes teilhydrolysiertes Haferpelzenxylan) verwendet.

Die Aktivitätsbestimmung mit niedermolekularem Filtrat als Substrat ergab mit Enzympräparat Barlican® (*T. reesei* I) in Natriumacetatpuffer (Abb. 31) größere Lysezonen als mit dem hochmolekularen Retentat. Agardiffusionstests mit teilhydrolysiertem Haferspelzenxylan als Substrat zur Enzymaktivitätsbestimmung von Enzympräparat Barlican® in den Futtermittlextrakten A (Abb. 32) und G (ohne Abbildung) führten zu nicht eindeutigen Ergebnissen. Mit Retentat als Substrat waren die Lysezonen, die bei kleineren Enzymkonzentrationen erhalten wurden größer als die Lysezonen, die mit unbehandeltem Haferspelzenxylan erhalten wurden. Bei höheren Enzymkonzentration waren die Lysezonen, die unter Verwendung des Retentats bzw. des unfiltrierten Haferspelzenxylans als Substrat erhalten wurden, größer. Die logarithmische Auftragung der Enzymkonzentrationen gegen die Flächen der Lysezonen, die mit Enzympräparat Barlican® in Futtermittel G-Extrakt (ohne Abbildung) aufgenommen wurden, lieferte über den geprüften Konzentrationsbereich von 0,01–0,5 IE/ml keinen linearen Zusammenhang.

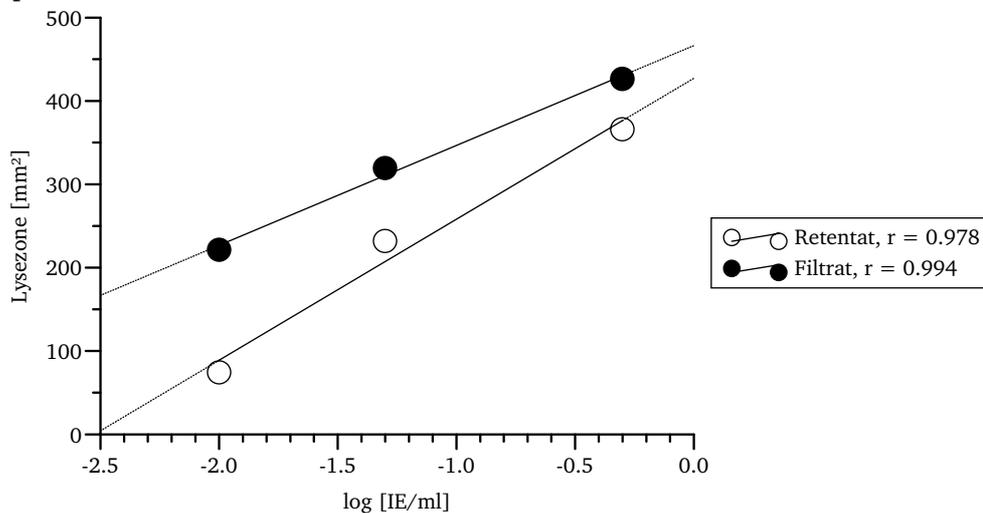


Abbildung 31: Agardiffusionstest mit enzymatisch hydrolysiertem (15 min) und durch Filtration in hoch- und niedermolekulares fraktioniertes Haferspelzenxylans als Substrat, Enzympräparat Barlican® (*T. reesei* I) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

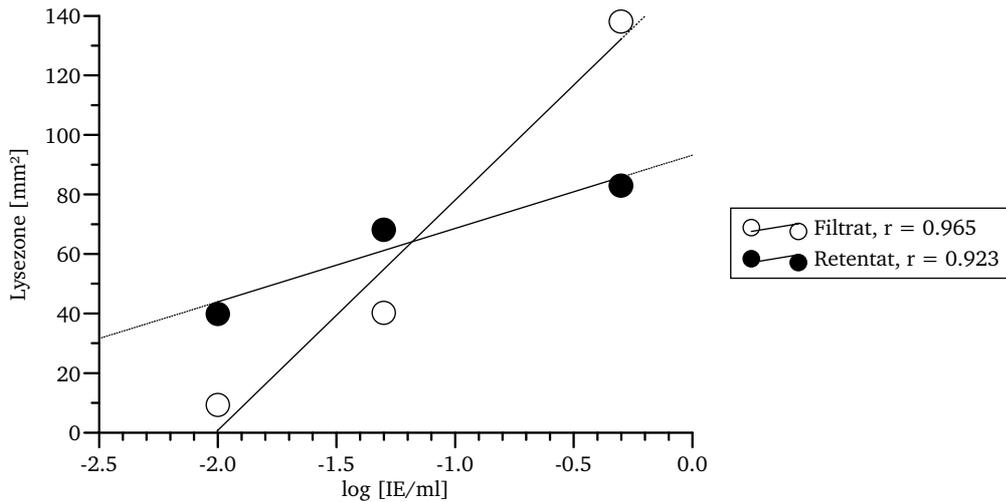


Abbildung 32: Agardiffusionstest mit enzymatisch hydrolysiertem (15 min) und durch Filtration fraktioniertem Haferspelzenxylan, Enzympräparat Barlican® (*T. reesei I*) im Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0

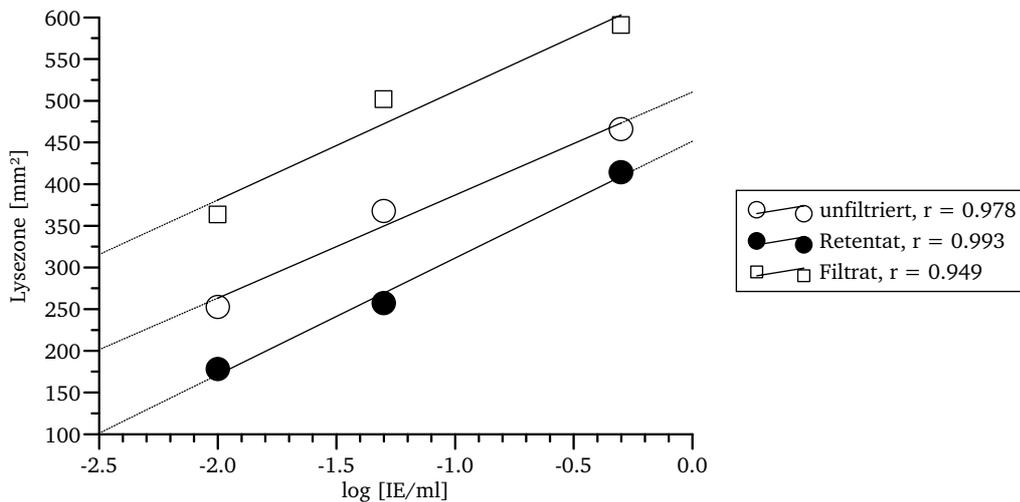


Abbildung 33: Agardiffusionstest mit kontinuierlich enzymatisch hydrolysiertem und durch Filtration fraktioniertem Haferspelzenxylan und 15 min teilhydrolysiertem unfiltriertem Haferspelzenxylan als Substrat, Enzympräparat Barlican® (*T. reesei I*) in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

Die Aktivitätsbestimmung von Enzympräparat Barlican® mit niedermolekularem Filtrat des kontinuierlich hydrolysiertem Xylan als Substrat zeigt führt zu größeren Lysezonengrößen als das hochmolekulare Retentat das unfiltrierte teilhydrolysierte Haferspelzenxylan (Abb. 33). Für die Größe der Lysezonengrößen ergab sich für die enzymatisch modifizierten Substrate die Reihenfolge: Filtrat > unfiltriert > Retentat.

Sauer hydrolysiertes und anschließend neutralisiertes Haferspelzenxylan war als Substrat im Agardiffusionstest nicht brauchbar, da die Molmasse unter die Anfärbgrenze von Kongorot hydrolysiert wurde und deshalb keine Lysezonengrößen erkennbar waren.

Das Haferspelzenxylan wurde im Trockenschrank bei 105°C 24 h getrocknet (getempert), um das eingelagerte Wasser zu entfernen. Die Verwendung des getemperten Haferspelzenxylan als Substrat zur Aktivitätsbestimmung der Präparate Barlican® und Lyxasan® ergab sowohl für die Enzympräparate in Natriumacetatpuffer pH 6,0, als auch für Enzympräparate in Futtermittlextrakten A und G (beide bei pH 6,0) geringfügig größere Lysezonen (ohne Abbildung) im Vergleich zur Verwendung von unbehandeltem Substrat. Die logarithmische Auftragung der Enzymkonzentrationen gegen die Flächen ergab einen linearen Zusammenhang (ohne Abbildung) über den geprüften Konzentrationsbereich von 0,01–0,5 IE/ml.

Die Aktivitätsbestimmungen von Enzympräparaten in Natriumacetatpuffer zeigten deutlich größere Lysezonen im Vergleich zum entsprechenden unbehandelten Haferspelzenxylan mit dem ultraschallbehandelten und ungefälltem Xylan, dem Retentat des ultraschallbehandelten Xylans, dem Zentrifugat des autoklavierten Xylans und dem Filtrat des enzymatisch hydrolysierten Xylans.

Nur mit ultraschallbehandeltem und autoklaviertem Haferspelzenxylan wurden größere Lysezonen im Vergleich zu unbehandeltem Haferspelzenxylan aus der gleichen Charge bei Enzymaktivitätsbestimmungen in Futtermittlextrakten erhalten. Beide Methoden zur Substratmodifikation sind praktikabel, d.h. sie sind schnell und einfach für größere Mengen Substrat durchzuführen. Deshalb wurden für die weiteren Untersuchungen Ultraschall- und Autoklavbehandlung ausgewählt. Die modifizierten Haferspelzenxylane wurden direkt aus der Lösung eingesetzt. Die Konzentration wurde zuvor mit der Trockensubstanzmethode bestimmt und entsprechend verdünnt. Für die Enzymaktivitätsbestimmungen wurden die Enzympräparate Biofeed Wheat® (*A. oryzae*, nur eine Aktivität auf Xylan) und Lyxasan® (*A. niger I*, mehr als 2 Aktivitäten auf Xylan) eingesetzt.

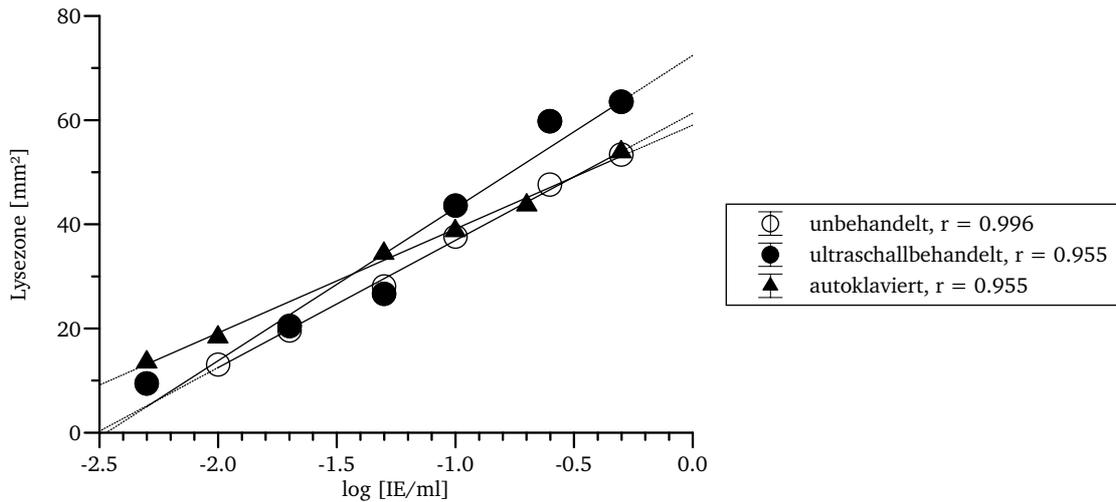


Abbildung 34: Agardiffusionstest mit unbehandeltem, ultraschallbehandeltem und autoklaviertem Haferspelzenxylan als Substrat, Enzympräparat Biofeed Wheat® (*A. oryzae*) in Natriumacetatpuffer pH 6,0

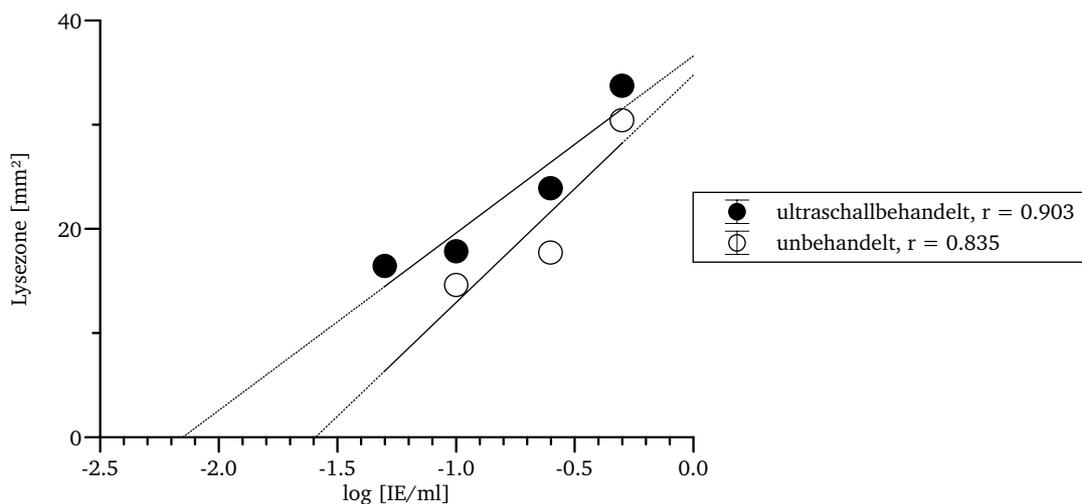


Abbildung 35: Agardiffusionstest mit ultraschallbehandeltem und unbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat, Enzympräparat Biofeed Wheat® (*A. oryzae*) im Futtermittel A-Extrakt pH 6,0

Mit dem ultraschallbehandelten Haferspelzenxylan wurden mit Enzympräparat Biofeed Wheat® (*A. oryzae*) in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 (Abb. 34), Futtermittel-A- (Abb. 35) und Gerste-Extrakt (Abb. 36) (alle bei pH 6,0) größere Lysezonen als mit dem unbehandelten und autoklavierten Haferspelzenxylan als Substrat erhalten. In Natriumacetatpuffer waren die Größenunterschiede zwischen Lysezonen, die mit den drei Substratmodifikationen erzielt wurden, gering. Die deutlichsten Größenunterschiede zwischen den Lysezonen unter Verwendung von den verschiedenen Substraten wurden mit dem Enzympräparat Biofeed Wheat® im Gerste-Extrakt erzielt.

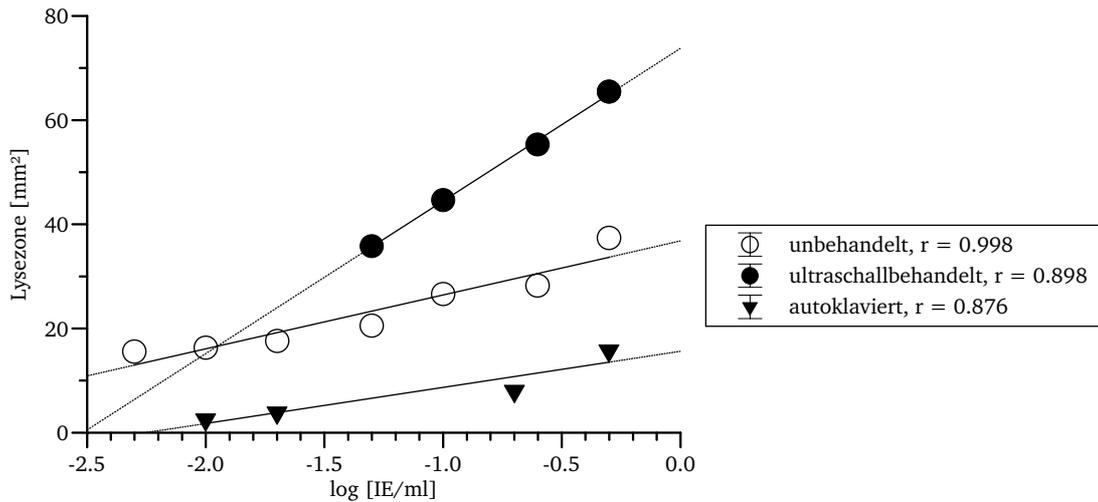


Abbildung 36: Agardiffusionstest mit unbehandeltem, ultraschallbehandeltem und autoklavierten Haferspelzenxylan als Substrat, Enzympräparat Biofeed Wheat® (*A. oryzae*) in Gerste-Extrakt pH 6,0

Kurz zusammengefaßt führten die Vergleichsuntersuchungen der verschiedenen Xylanmodifikationen in Agardiffusionstests mit Biofeed Wheat® zu folgenden Ergebnissen: Die Lysezonen, die mit ultraschallbehandelten Haferspelzenxylan erhalten wurden, waren größer und klarer abgegrenzt (heller) und dadurch besser auswertbar, da vollständiger hydrolysiert, als die Lysezonen, die mit unbehandeltem Xylan gleicher Charge erhalten wurden. Die kleinsten Lysezonen wurden mit dem autoklavierten Haferspelzenxylan erhalten. Die Steigungen der Kalibrationsgeraden die mit Enzympräparat Biofeed Wheat® in Natriumacetatpuffer mit ultraschallbehandeltem und unbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat erhalten wurden, waren ähnlich und in Futtermittlextrakt (A) unterschiedlich (Tab. 11).

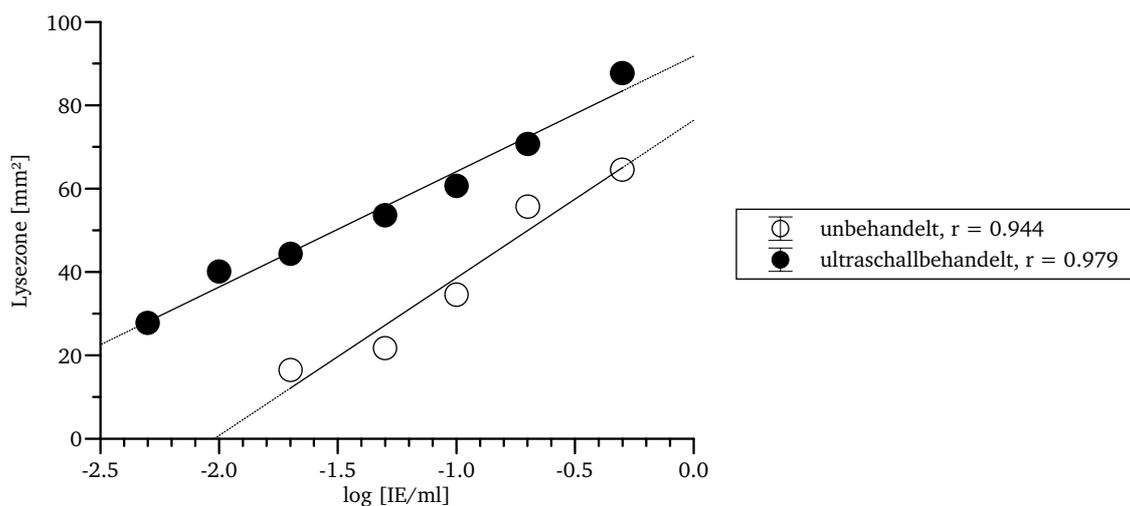


Abbildung 37: Agardiffusionstest mit unbehandeltem und ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*) in Futtermittel A-Extrakt pH 6,0

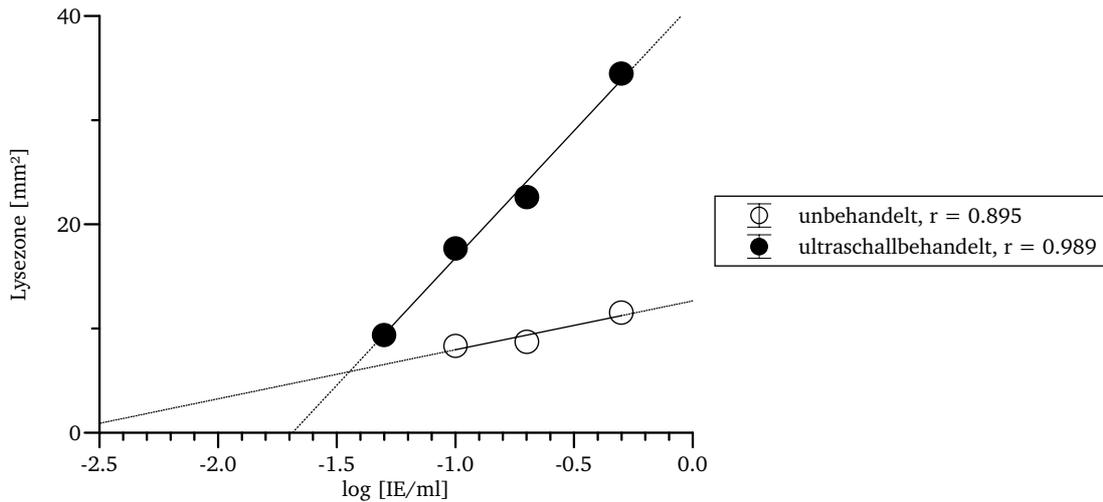


Abbildung 38: Agardiffusionstest mit unbehandeltem und ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*) in Gerste-Extrakt

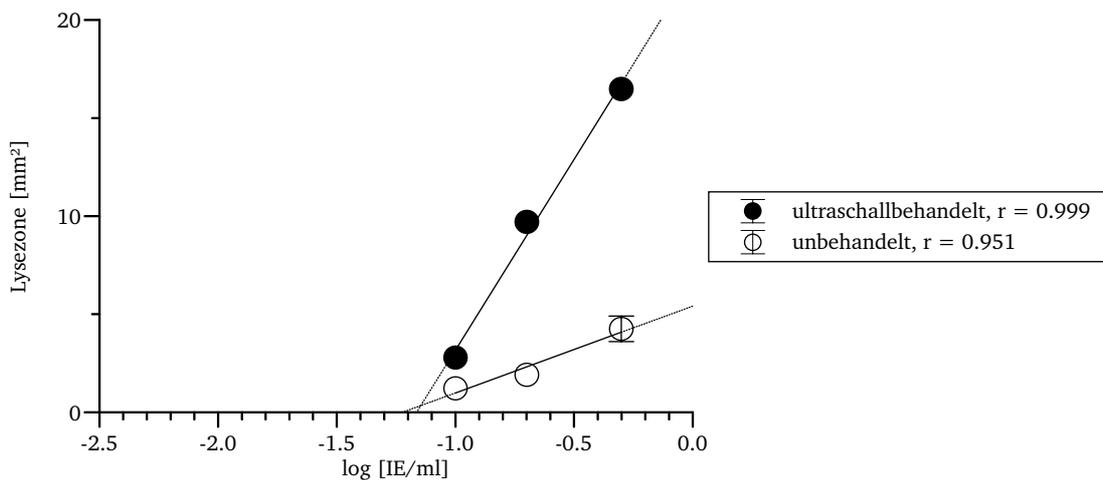


Abbildung 39: Agardiffusionstest mit ultraschallbehandeltem und unbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*) in Weizenextrakt bei pH 6,0

Bei Enzymaktivitätsbestimmungen des Präparates Lyxasan® (*A. niger I*) wurden in Natriumacetatpuffer (ohne Abb.), Futtermittel A- (Abb. 37), in Gerste- (Abb. 38) und in Weizenextrakt (Abb. 39) mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat größere und besser auswertbare Lysezonen (heller, deutlicher abgegrenzt) erhalten als mit dem unbehandeltem. Die Lysezonen, die mit autoklavierten Haferspelzenxylan als Substrat erhalten wurden, waren nicht auswertbar. Die Steigungen der Kalibrationsgeraden mit ultraschallbehandelten Haferspelzenxylan als Substrat waren mit Enzympräparat Lyxasan® in Natriumacetatpuffer, Futtermittel A- und Weizenextrakt (jeweils bei pH 6,0) steiler, als die Steigungen, die mit unbehandeltem Xylan als Substrat erhalten wurden. Die Unterschiede zwischen den Steigungen der Kalibrationsgeraden waren bei der Aktivitätsbestimmung von Enzympräparat Lyxasan® und Biofeed

Wheat® im Futtermittlextrakt zwischen den verwendeten Substraten größer als bei den Enzymaktivitätsbestimmungen, die im Natriumacetatpuffer durchgeführt wurden (Tab. 11).

Tabelle 11: Geradensteigungen von Biofeed Wheat® u. Lyxasan® in verschiedenen Medien, unbehandeltes und ultraschallbehandeltes Haferspelzenxylan

Medium	Haferspelzenxylanmodifikation	Biofeed Wheat	Lyxasan
Natriumacetatpuffer pH 6,0	unbehandelt	24	27
	ultraschallbehandelt	27	28
Futtermittel A-Extrakt pH 6,0	unbehandelt	17	5
	ultraschallbehandelt	21	24

Die Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen Substratmodifikationen (autoklaviert, ultraschallbehandelt, unbehandelt) unter Verwendung der Enzympräparate Biofeed Wheat® und Lyxasan® in verschiedenen Probenmatrices zeigten, das autoklaviertes und unbehandeltes Haferspelzenxylan für die Enzymaktivitätsbestimmung in komplexen Proben nicht so gut geeignet war, wie das ultraschallbehandelte. Enzympräparat Biofeed Wheat® ließ sich in Natriumacetatpuffer, Futtermittel A- und Gerstenextrakt in der Vergleichsuntersuchung mit autoklaviertem Haferspelzenxylan als Substrat bestimmen, Enzympräparat Lyxasan® nicht.

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Agardiffusionstests mit verschiedenen Substraten zusammengestellt. Im Vergleich zu unbehandeltem Haferspelzenxylan gleicher Charge führten Enzymaktivitätsbestimmungen in Natriumacetatpuffer, Futtermittel A- oder Weizenextrakten mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat immer zu größeren Lysezonen, also zu einem empfindlicherem Meßbereich als mit entsprechenden unbehandeltem und autoklaviertem Haferspelzenxylan als Substrat. Sie waren auch deutlicher zu erkennen, da sie klarer abgegrenzt (heller) waren und deshalb nach der Kongorotanfärbung einen stärkeren Kontrast zu dem angefärbten Xylan zeigten. Mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat ließen sich Enzymkonzentrationen bis zu 0,005 IE/ml (0,01 mit unbehandeltem Xylan gleicher Charge) im Natriumacetatpuffer bei pH 6,0, 0,005 IE/ml, im Gerste-Extrakt (0,02 IE/ml mit unbehandeltem Haferspelzenxylan, Abb. 38) nachzuweisen. Ein vergrößerter Meßbereich ließ sich auch mit anderen Behandlungen (enzymatisch und filtriert, autoklaviert, etc.) erreichen, aber diese Substrate brachten nicht in allen Versuchsmatrices auswertbare Lysezonen.

Tabelle 12: Verschiedene Haferspelzenxyylanmodifikationen als Substrat im Agardiffusionstest zur Bestimmung von Enzymaktivität in verschiedenen Matrices

Modifikation	Detektionsgrenze [IE/ml]	Meßbereich* [mm ²] Lysezone	Abbildung Nr.
Natriumacetatpuffer pH 6,0			
unbehandelt	0,010	10–50	34
ultraschallbehandelt	0,005	10–60	34
autoklaviert, Zentrifugat	0,005	10–40	34
ultraschallbehandelt, ethanolisch gefällt	0,010	80–150	22
ultraschallbehandelt, niedermolekulares Filtrat	0,010	150–300	26
ultraschallbehandelt, hochmolekulares Filtrat	0,010	200–350	26
carboxymethyliert	0,010	55–105	28
autoklaviert, Zentrifugat	0,010	150–200	29
enzymatisch hydrolysiert, hochmolekulares Retentat	0,010	50–300	31
enzymatisch hydrolysiert, hochmolekulares Filtrat	0,010	200–400	31
Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
unbehandelt	0,020	20–60	37
ultraschallbehandelt	0,005	20–85	37
enzymatisch hydrolysiert, hochmolekulares Filtrat	0,010	40–60	32
enzymatisch hydrolysiert, niedermolekulares Filtrat	0,010	5–140	32
autoklaviert, Zentrifugat	0,010	40–80	30
ultraschallbehandelt, niedermolekulares Filtrat	0,010	65–80	27
ultraschallbehandelt, hochmolekulares Filtrat	0,010	80–90	27
Weizen-Extrakt pH 6,0			
unbehandelt	0,050	10–60	25
ultraschallbehandelt	0,050	30–70	25
Gerste-Extrakt pH 6,0			
unbehandelt	0,005	15–30	36
ultraschallbehandelt	0,005	30–60	36
autoklaviert, Zentrifugat	0,050	2–10	36
*der Meßbereich hängt von der verwendeten Haferspelzenxyylancharge ab; es wird stets der lineare Meßbereich (Fläche-log [IE/ml]) angeben			

5.2.1.2 Bestimmung der β -Glucanaseaktivität

Im folgenden werden die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmung von β -Glucanasen in Futtermitteln und die Verbesserung der Aktivitätsbestimmung durch ein ultraschallbehandeltes Substrat dargestellt.

Abbildung 40 zeigt steigende Enzymkonzentrationen verschiedener Enzympräparate, die logarithmisch gegen den Durchmesser der Lysezonen aufgetragen wurden. Die Kalibrationsgeraden der Enzympräparate hatten unterschiedliche Steigungen, d.h. die Enzympräparate reagierten unterschiedlich auf dasselbe Substrat. Auch Enzympräparate gleicher mikrobieller Herkunft (*A. niger I* u. *II*) reagieren unterschiedlich auf das gleiche Substrat.

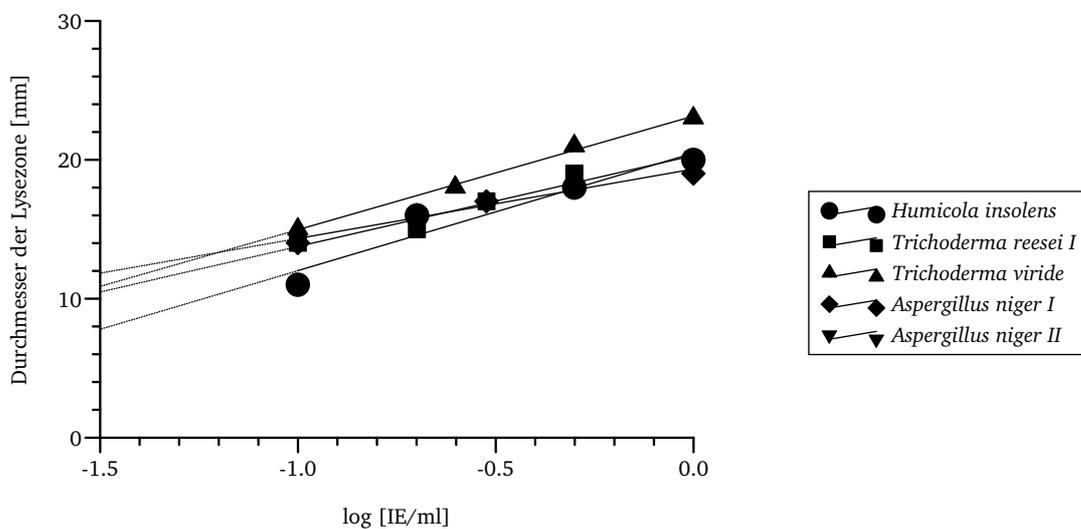


Abbildung 40: Agardiffusionstest mit unbehandeltem β -Glucan als Substrat zur Bestimmung der Aktivität auf β -Glucan von verschiedenen Enzympräparaten in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

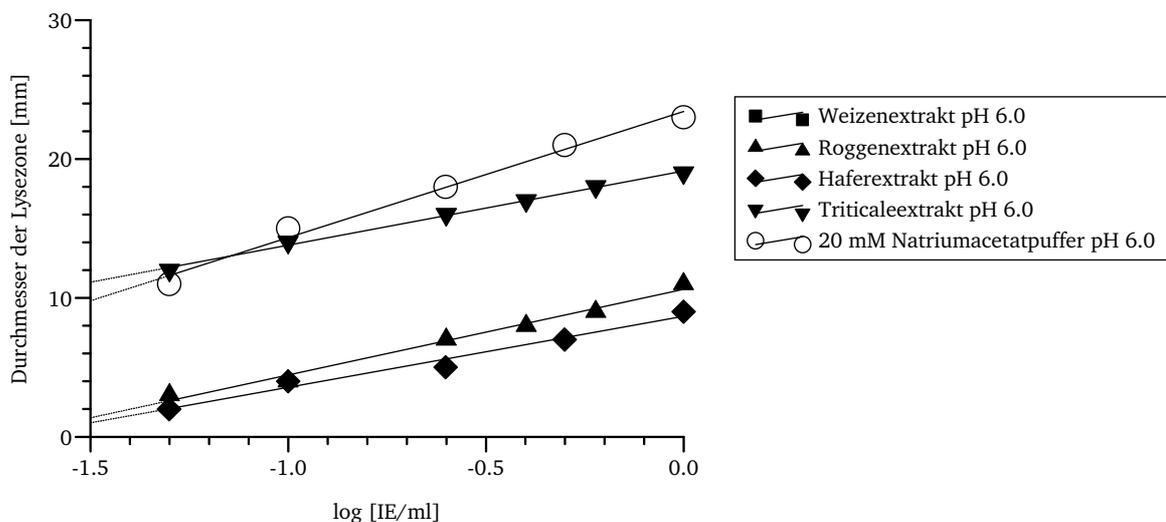


Abbildung 41: Einfluß von Getreideextrakten auf die Bestimmung der β -Glucanaseaktivität von Enzympräparat Roxazyme® (*T. viride*) mittels Agardiffusionstest mit β -Glucan als Substrat

Um den Einfluß des Getreides auf die Enzymaktivitätsbestimmungen zu untersuchen, wurden Enzympräparate in Getreideextrakten gelöst und in steigender Konzentration gegen den Durchmesser der Lysezonen auf die Agarplatten aufgetragen. Es ergaben sich für alle Getreideextrakte ähnliche Steigungen der Geraden (Abb. 41). Der Einfluß der einzelnen Getreide zeigte bei allen untersuchten Präparaten die gleichen Abstufungen. Das läßt den Schluß zu, daß die Inaktivierung oder Inhibition der Enzyme durch die einzelnen Getreide unabhängig von der Art der Enzyme ist.

Das Gersten- β -Glucan wurde ultraschallbehandelt, wie zuvor das Haferspelzenxylan. Die Konzentration des gelösten Gersten- β -Glucans wurde mittels der Trockensubstanzmethode bestimmt und die Lösungen entsprechend verdünnt. Für die Enzymtests wurde das β -Glucanase betonte Enzympräparat Energex[®] (*A. niger II*) in steigender Konzentration in Natriumacetatpuffer, Getreide- und Futtermittel A-Extrakt (alles bei pH 6,0) auf die Agarplatten aufgetragen. Die Fläche der Lysezonen wurde mit dem Photodokumentationssystem der Fa. Raytest, Straubhardt ausgewertet.

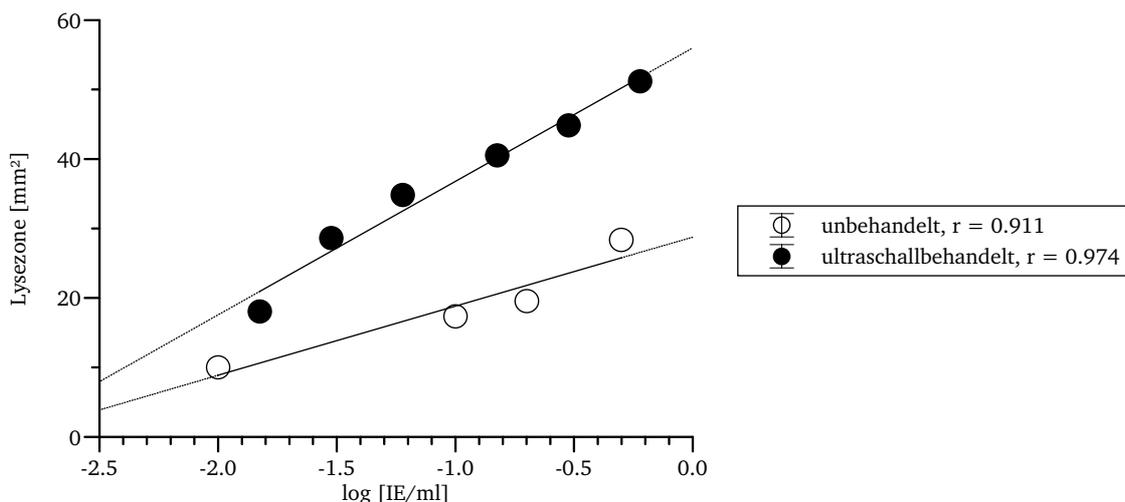


Abbildung 42: Agardiffusionstest mit unbehandeltem und ultraschallbehandeltem Gersten- β -Glucan als Substrat, Enzympräparat Energex[®] (*A. niger II*) in Natriumacetatpuffer pH 6,0

Die Lysezonen, die durch die Hydrolyse von ultraschallbehandeltem β -Glucan mit Enzympräparat Energex[®] in Natriumacetatpuffer (Abb. 42), in Weizen- (Abb. 43), Gerste-Extrakt (ohne Abb.) und Futtermittel A-Extrakt (Abb. 44) erzeugt wurden (alle bei pH 6,0), waren größer und besser auswertbar (deutlicher abgegrenzt) als die Lysezonen, die mit unbehandeltem β -Glucan unter gleichen Bedingungen erhalten wurden. Dadurch wurde der Meßbereich ca. verdoppelt und die Detektionsgrenze in allen Versuchsmatrices verbessert. Auch die Linearität der Kalibrationsgeraden war mit dem ultraschallbehandelten β -Glucan besser als mit dem unbehandelten. Durch die Verwendung von ultraschallbehandeltem β -Glucan im Agardiffusionstest ließ sich die

Bestimmung der Enzymaktivität auf β -Glucan in Getreide- (Gerste und Weizen) und Futtermittel A-Extrakt von 0,1 IE/ml auf 0,02 IE/ml um den Faktor 5 verbessern (Tab. 13).

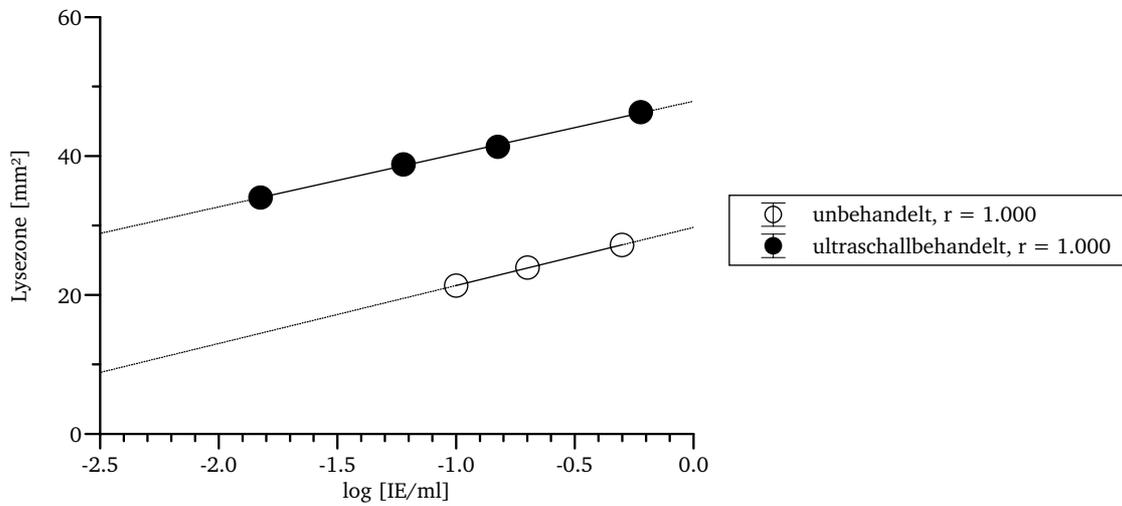


Abbildung 43: Agardiffusionstest mit unbehandeltem und ultraschallbehandeltem Gersten- β -Glucan als Substrat, Enzympräparat Energex[®] (*A. niger II*) in Weizenextrakt pH 6,0

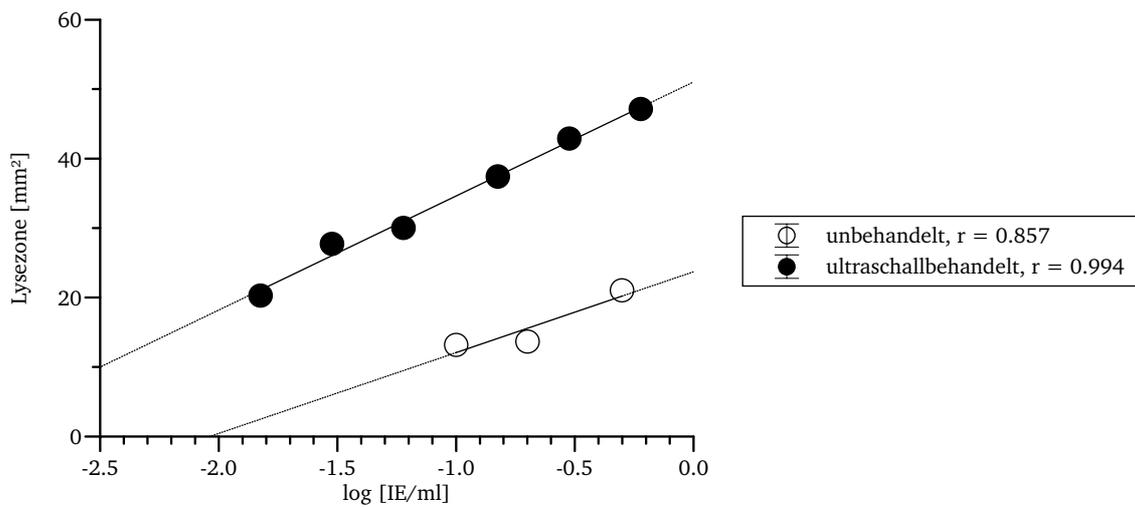


Abbildung 44: Agardiffusionstest mit unbehandeltem und ultraschallbehandeltem Gersten- β -Glucan als Substrat, Enzympräparat Energex[®] (*A. niger II*) in Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0

Tabelle 13: β -Glucan, unbehandelt und ultraschallbehandelt als Substrat im Agardiffusionstest zur Bestimmung von Enzympräparat in verschiedenen Matrices

Modifikation	Detektionsgrenze [IE/ml]	Meßbereich* [mm ²] Lysezone	Abbildung Nr.
Natriumacetatpuffer pH 6,0			
unbehandelt	0,02	10–20	42
ultraschallbehandelt	0,01	20–50	42
Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
unbehandelt	0,10	10–20	44
ultraschallbehandelt	0,02	20–50	44
Weizen-Extrakt pH 6,0			
unbehandelt	0,10	10–20	43
ultraschallbehandelt	0,02	30–40	43
Gersten-Extrakt pH 6,0			
unbehandelt	0,10	10–20	ohne
ultraschallbehandelt	0,02	30–50	ohne

*der Meßbereich hängt von der verwendeten β -Glucancharge ab;
es wird stets der lineare Meßbereich (Fläche–log [IE/ml]) angegeben

5.2.2 Bestimmung der Enzymaktivität auf Basis der Viskositätsabnahme

Die Abnahme der Viskosität im Verdauungstrakt ist das Hauptziel der Verwendung von β -Glucanasen und Xylanasen. Die Viskositätssenkung ist deshalb ein wichtiges Beurteilungskriterium für die Enzymwirkung. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden deshalb Substratlösungen mit steigenden Enzymkonzentration versetzt und nach der Inkubation gemessen. Es wurde als zweite Variante die Viskositätsbestimmung nach 5 bzw. 35 min Inkubation aus derselben Probe, gewählt, da die Streuung der Viskositätswerte in verschiedenen Proben zu groß war.

Die Differenz zwischen der 5 min und der 35 min Inkubation wurde gegen die Enzymkonzentration aufgetragen. Die Enzymaktivitätsbestimmung mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan als Substrat konnte ohne 5 min Messung durchgeführt werden, da viele Viskositätsbestimmungen zeigten, daß es nur minimale Differenzen zwischen den einzelnen Parallelproben gab (<0,05 mPas).

Die aus der Differenzmessung von 5 und 35 min Inkubation erhaltenen Werte wurden gegen die logarithmierten Konzentrationen aufgetragen (Abb. 45). Der Linearitätsbereich ist auf

0,1–0,6 IE/ml eingeschränkt. Es gab unterschiedliche Steigungen bei den verschiedenen Enzympräparaten. Das Substrat Lichenin hatte eine schlechte Empfindlichkeit (max. 1,5 mPas Differenz).

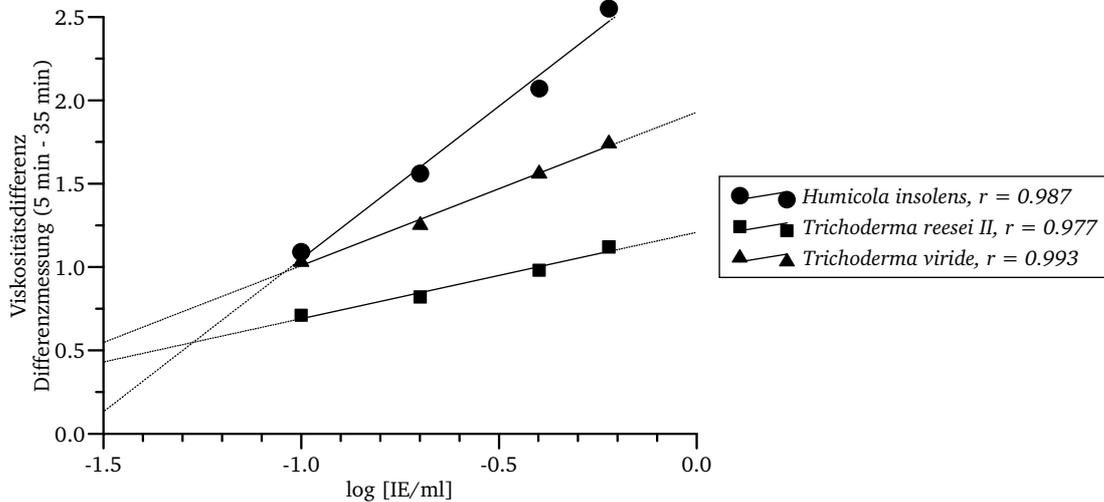


Abbildung 45: Bestimmung der β -Glucanaseaktivitäten von verschiedenen Enzympräparaten in Natriumacetatpuffer pH 6,0 auf Basis der Viskositätsabnahme, Substrat Lichenin (β -Glucan)

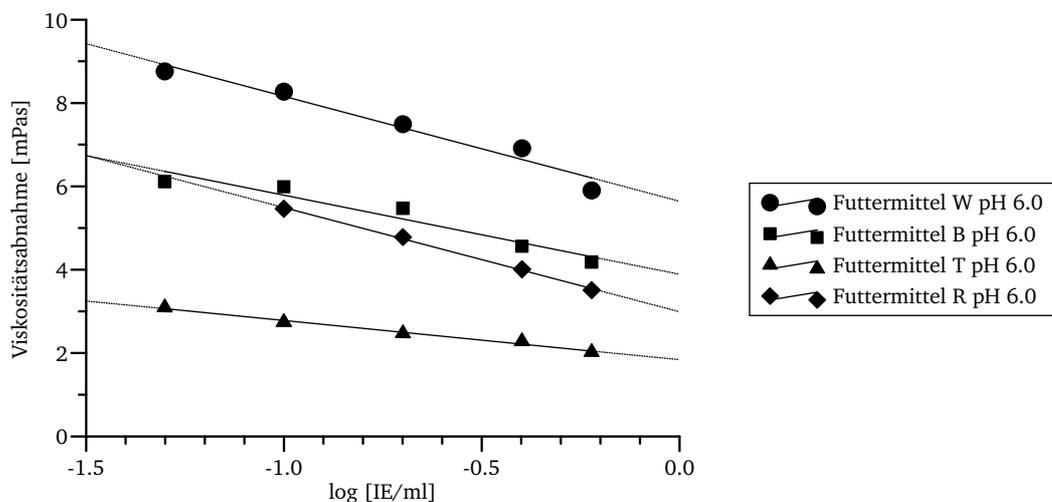


Abbildung 46: Bestimmung der β -Glucanaseaktivität von Enzympräparat Roxazyme® (*Trichoderma viride*) in verschiedenen Futtermittlextrakten bei pH 6,0 auf Basis der Viskositätsabnahme, Substrat Lichenin (β -Glucan)

Um festzustellen, ob die Viskositätsmessung ebenfalls durch Matrixeffekte beeinflusst wird, wurden Kalibrationsreihen mit dem β -Glucanase-betonten *T. reesei II*-Präparat in den Extrakten verschiedener Futtermittel erstellt. Eine Auswertung der Differenz zwischen dem Meßwert bei 0 min war wegen starker Schwankung nicht möglich. Deshalb wurde die Viskositätssenkung aus der Differenzmessung nach 5 und 35 min Inkubation als Grundlage zur Erstellung der Kalibra-

tionsreihen verwendet (Abb. 46). Es lag eine geringe Empfindlichkeit vor (max. 2,3 mPas Abnahme).

Tabelle 14: Geradensteigungen von Enzymaktivitäten der Präparate *T. viride* und *T. reesei II* auf β -Glucan, Aktivitätsbestimmung durch Viskositätsabnahme

Futtermittel	<i>T. reesei II</i>	<i>T. viride</i>
W (Weizen)	-2.18	-2.59
B (Gerste)	-3.4	-1.84

Bei Verwendung von Lichenin (ein β -Glucan) als Substrat und Extrakten aus xylanreichen Futtermittel ergaben sich im Xylanase betonten *T. viride* Enzympräparat (12780 IE/g Xylanase, 2530 IE/g Glucanase) steilere Abnahmen als in dem Glucanase betonten Enzympräparat *T. reesei II* (3760 IE/g Xylanase; 12820 IE/g Glucanase). Bei Enzymaktivitätsbestimmungen in Gerste-Extrakten war dies umgekehrt (Tab. 14).

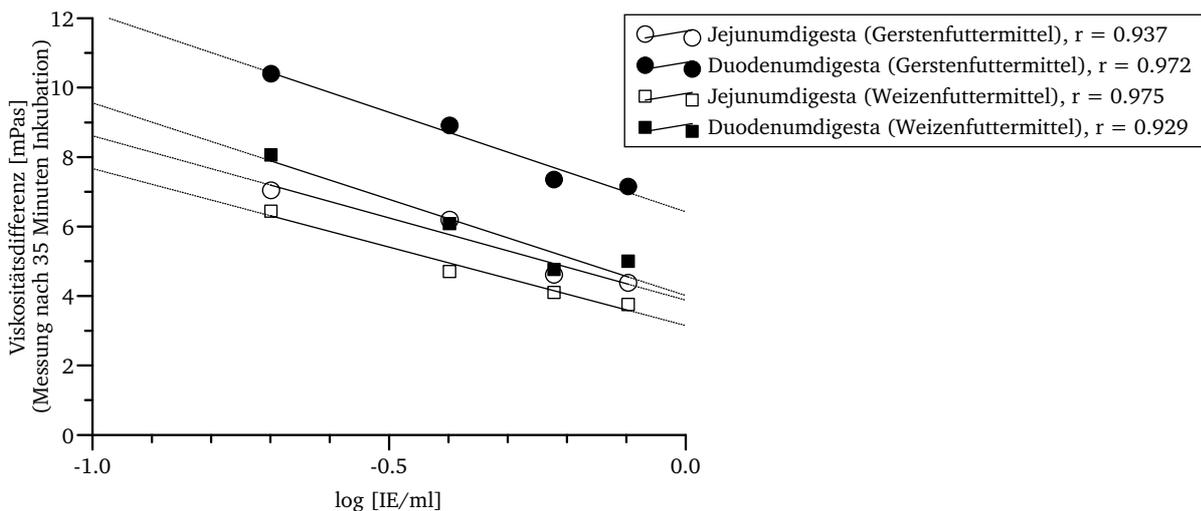


Abbildung 47: Enzymaktivitätsbestimmung (β -Glucanase) von Roxazyme® (*Trichoderma viride*) in Jejunum- und Duodenumdigestaextrakten pH ca. 6 auf Basis von Viskositätsabnahme, Viskositätsmessung durch Differenzbildung, Substrat Lichenin (β -Glucan)

Aus Fütterungsversuchen mit Küken, die verschiedene Getreidezulagen als Futtermittel erhielten, wurden nicht enzymesupplementierte Proben aus Jejunum und Duodenum genommen. Die Eichreihen der Digestaüberstände wurden ebenfalls durch die Matrix der Digesta beeinflusst. Die Empfindlichkeit war schlecht, da die Meßreihen nur eine Differenz von 2 mPas aufwiesen. Der Linearitätsbereich für das Substrat Lichenin (β -Glucan) lag zwischen 0,1–0,6 IE/ml (Abb. 47).

Für vergleichende Messungen müssen die Versuchsparameter exakt eingehalten werden, da bereits geringe Abweichungen in der Probenvorbereitung oder der Temperatur zu Meßfehlern führen.

Zur Enzymaktivitätsbestimmung mittels Viskositätsreduktion waren nur 4–5%ige ultraschallbehandelte Haferspelzenxylanlösungen geeignet. Andere Substratlösungen wie z.B. 2%iges Haferspelzenxylan oder Carboxymethylxylan hatten eine zu geringe Viskosität und ergaben in Parallelproben eine starke Streuung. Ein weiterer Grund ist das initiale Ansteigen der Viskosität (4–5%ige unbehandelte Haferspelzenxylanlösung) nach der Enzymzugabe, da durch die enzymatische Hydrolyse Teile des Haferspelzenxylanpolymers in Lösung gehen. Dieses wurde mit Start- und Endpunktmessungen korrigiert. Mit ultraschallbehandeltem Xylan entfällt diese Korrektur. Die mit ultraschallbehandeltem Xylan ermittelten Viskositäten hatten eine sehr geringe Standardabweichung ($<0,05$ mPas). Dadurch reichte eine einmalige Viskositätsmessung am Ende der Inkubation die Viskosität. Eine Inkubationszeit von einer Stunde führte zu besseren Detektionsgrenzen (0,01 IE/ml in Natriumacetatpuffer, ca. doppelte Empfindlichkeit, Abb. 48) im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 30 min. Keine wesentliche Verbesserung bewirkte eine Inkubationszeit von 3 h. Ultraschallbehandelte Haferspelzenxylanlösungen hatten unterschiedliche Ausgangsviskositäten und mußten zur viskosimetrischen Bestimmung von Xylanaseaktivitäten auf gleiche Ausgangsviskosität von 8–10 mPas verdünnt werden. Xylanlösungen mit höheren Viskositäten (unverdünnt hatte eine 5%ige ultraschallbehandelte Lösung eine Viskosität von ca. 20 mPas) waren für Enzymaktivitätsbestimmungen ungeeignet, da nach einer Inkubationszeit von 1 h keine deutliche Viskositätsabnahme auftritt.

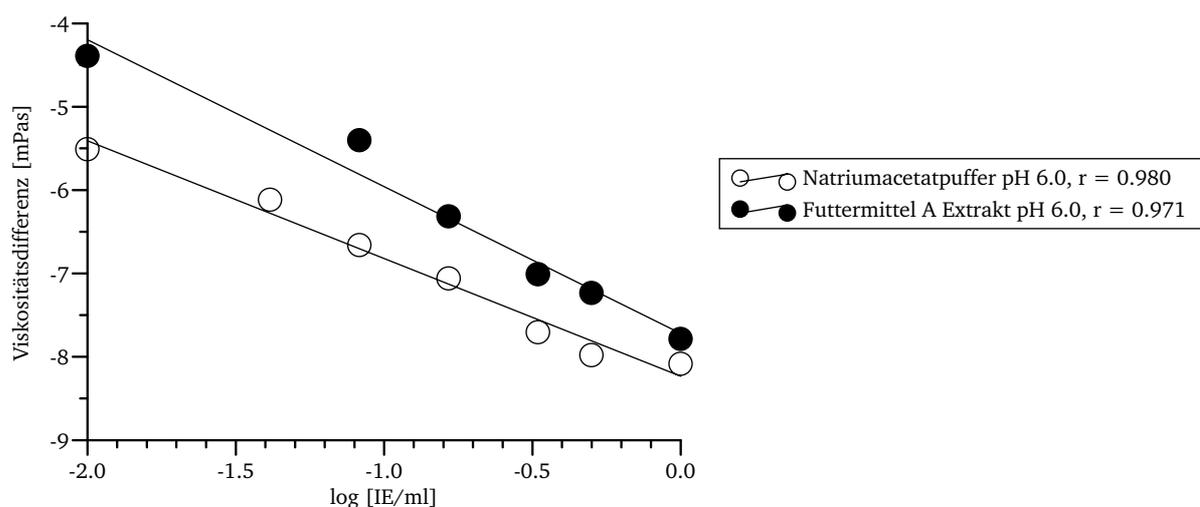


Abbildung 48: Aktivitätsbestimmung von Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger* I) auf Basis der Viskositätsabnahme, 1 h Inkubation bei 40°C, Substrat 4%ige ultraschallbehandelte Haferspelzenxylanlösung

Mit 4%iger ultraschallbehandelter Haferspelzenxylanlösung konnten Xylanaseaktivitäten in Futtermittel-, (s. Abb. 48 Enzympräparat Lyxasan® in Futtermittel A-Extrakt und in Natriumacetatpuffer) Gerste- und Weizenextrakten (ohne Abb.) bestimmt werden.

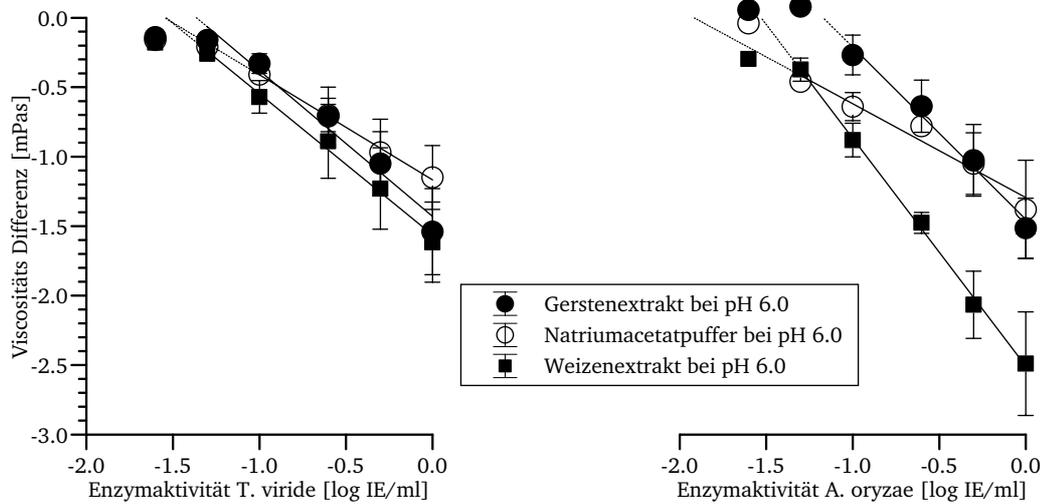


Abbildung 49: Einfluß von Weizen- und Gerstenextrakt auf die Bestimmung von Xylanaseaktivität der Enzympräparate Roxazyme® (*T. viride*) und Biofeed Wheat® (*A. oryzae*) auf Basis der Viskositätsabsenkung, T=40°C, Substrat 4%ige ultraschallbehandelte Haferspelzenxylanlösung, veröffentlicht in VAHJEN ET AL., 1997

Die Inkubation der Enzympräparate Roxazyme® (*T. viride*) und Biofeed Wheat® (*A. oryzae*) in verschiedenen Getreideextrakten mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan führte zu einer Viskositätsreduktion mit einer Detektionsgrenze von 0,05 und 0,01 IE/ml in Weizen und Gerste-Extrakten (Abb. 49). Die Getreidematrix beeinflusste die Enzymaktivität unterschiedlich, aber die Extrakte schienen einen geringeren Einfluß auf das Enzympräparat Biofeed Wheat® (*A. oryzae*, eine Aktivität auf Xylan) zu haben, als auf das Enzympräparat Roxazyme® (*T. viride*, mehrere Aktivitäten auf Xylan).

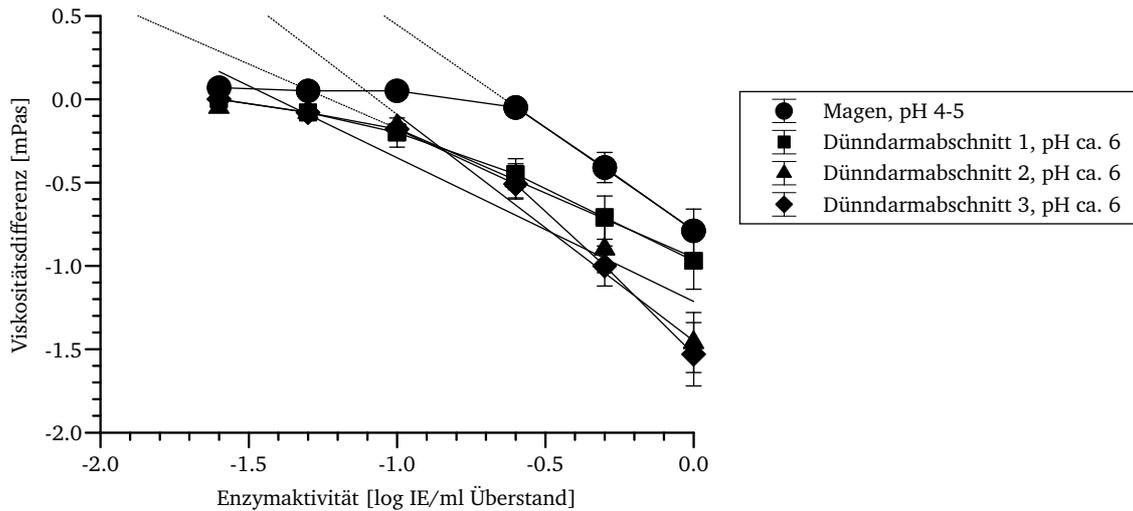


Abbildung 50: Einfluß von verschiedenen Ferkel-Digesta-Überständen auf die Bestimmung von Xylana-seaktivität des Enzympräparates Roxazyme® (*T. viride*) auf Basis der Viskositätsabsenkung, $T=40^{\circ}\text{C}$, Substrat 4%ige ultraschallbehandelte Haferspelzenxylanlösung, veröffentlicht in VAHJEN ET AL. 1997

Die Bestimmung von Enzymaktivität in Digestaüberständen von Ferkeln führte zu linearen Standardkurven von 0,1–1 IE/ml Überstand, mit der Ausnahme von Magendigesta. In Magendigesta lag die Bestimmungsgrenze bei 0,25 IE/ml (Abb. 50).

Tabelle 15: Enzymaktivitäten gegenüber Haferspelzenxylan und β -Glucan mittels Viskositätsabnahme in verschiedenen Matrices

Versuchsmatrix	Detektionsgrenze [IE/ml]	Meßbereich* (Viskositätsdifferenz) [mPas]	Abbildung Nr.
Haferspelzenxylan, ultraschallbehandelt			
Natriumacetatpuffer pH 6,0	0,010	6	48
Futtermittel A-Extrakt pH 6,0	0,010	5	48
Weizen-Extrakt pH 6,0	0,030	5	50
Gersten-Extrakt pH 6,0	0,030	5	50
Ferkeldigesta (Weizen-Futtermittel) pH ca. 6	0,025	4	ohne
Lichenin (β-Glucan)			
Natriumacetatpuffer pH 6,0	0,100 ¹	1,5	45
Jejunum- u. Duoderumdigesta (Weizen- u. Gersten-Futtermittel) pH ca. 6	0,100	2–4	47
Futtermittel W, B, T, R-Extrakt pH 6,0	0,050	2–4	46

* es wird stets der lineare Meßbereich (Viskosität–log [IE/ml]) angegeben,¹Start– Endpunktmethode

Tabelle 15 zeigt die Meßbereiche und Detektionsgrenzen, die mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan und Lichenin in verschiedenen Matrices erreicht werden konnten.

Autoklaviertes Haferspelzenxylan war ebenfalls zur Enzymaktivitätsbestimmung von Präparaten in Natriumacetatpuffer geeignet. In Futtermittel- bzw. Getreideextrakten waren die Ergebnisse mit diesem Substrat nicht jedoch eindeutig (ohne Abb.). Es war über den untersuchten Meßbereich (1–0,5 IE/ml) kein linearer Zusammenhang zu erkennen. Carboxymethyliertes Haferspelzenxylan war für die Viskositätsmessung nicht geeignet, weil die Viskositätsabsenkung zu gering war. Sie lag bei ca. 1,2 mPas nach einer Inkubationszeit von 1 h und einer Enzymkonzentration von 1 IE/ml in Natriumacetatpuffer. Bei niedrigeren Enzymkonzentrationen war keine Absenkung meßbar. Acetyliertes Haferspelzenxylan ließ sich zur viskosimetrischen Enzymbestimmung nicht verwenden, da die Löslichkeit im wässrigen Medium zu gering war.

5.2.3 Enzymaktivitätsbestimmung mit chromogenen Substraten

Chromogene Substrate bestehen aus einer enzymatisch hydrolysierbaren Komponente und einem Farbstoff. Die hydrolysierbaren Komponenten sind verschiedene Haferspelzenxylanderivate (autoklaviert, ultraschallbehandelt, carboxymethyliert und unbehandelt), β -Glucan oder Arabinoxylan. In dieser Arbeit wurden die chromogenen Substrate nach der Farbstoffkomponente in Substrate mit Reaktivfarbstoff, anionischen und kationischen Farbstoff eingeteilt. Zur Enzymbestimmung wurde die Freisetzung von Hydrolyseprodukten mit Farbstoff bzw. die Freisetzung von Farbstoff photometrisch gemessen. Dazu wurde chromogenes Substrat in Natriumacetatpuffer, Futtermittel-, Getreideextrakt oder Digestaüberständen mit Enzympräparat inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Hydrolyseprodukte mit Farbstoff bzw. der freien Farbstoffe gegen eine Blindprobe ohne Enzympräparat bestimmt.

Im folgenden werden die Enzymaktivitätsbestimmungen durch Substrate mit Reaktivfarbstoffen dokumentiert. Die Enzymaktivitäten wurden mit kommerziellen Azoarabinoxylan aus Weizen, Azo- β -glucan aus Gerste (beide von Fa. Megazyme, Irland, Farbstoffkomponente Azurin laut Herstellerangabe) und verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Farbstoff-Haferspelzenxylanderivaten untersucht. Die kommerziellen Produkte (Azo-arabinoxylan, Azo- β -glucan) wurden in Tablettenform und als Flüssigpräparat verwendet.

Standardkurven von *H. insolens* Enzympräparat in Natriumacetatpuffer und in verschiedenen Futtermittlextrakten wurden mit Glucazymetabletten aufgenommen (Abb. 51). Das Detektionslimit lag bei 0,05 IE/ml. Die Steigungen der Standardkurven (Tab. 16) der Enzyme in den verschiedenen Futtermittlextrakten waren deutlich verschieden. Die Kurve des Enzympräparates in Futtermittel R-Extrakt wich am wenigsten von der Standardkurve von Enzympräparat in

Futtermittel ab. Enzymaktivitäten in auf Hafer basierenden Futtermitteln ließen sich extrem schlecht bestimmen (ohne Abb.). Die Standardkurven von verschiedenen Enzympräparaten in Natriumacetatpuffer wurden mit Xylazymetabletten aufgenommen (Abb. 52). Gleiche Steigungen wurden bei *T. reesei II* (3,14) und bei *T. viride* (3,18) (Tab. 16) gefunden.

Tabelle 16: Steigungen der Standardkurven einiger Enzympräparate, bestimmt mit Glucazymetabletten in 20 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0

Enzympräparat	Steigung
<i>Humicola insolens</i>	3,18
<i>Trichoderma reesei II</i>	2,33
<i>Trichoderma viride</i>	3,14
<i>Aspergillus niger I</i>	4,32

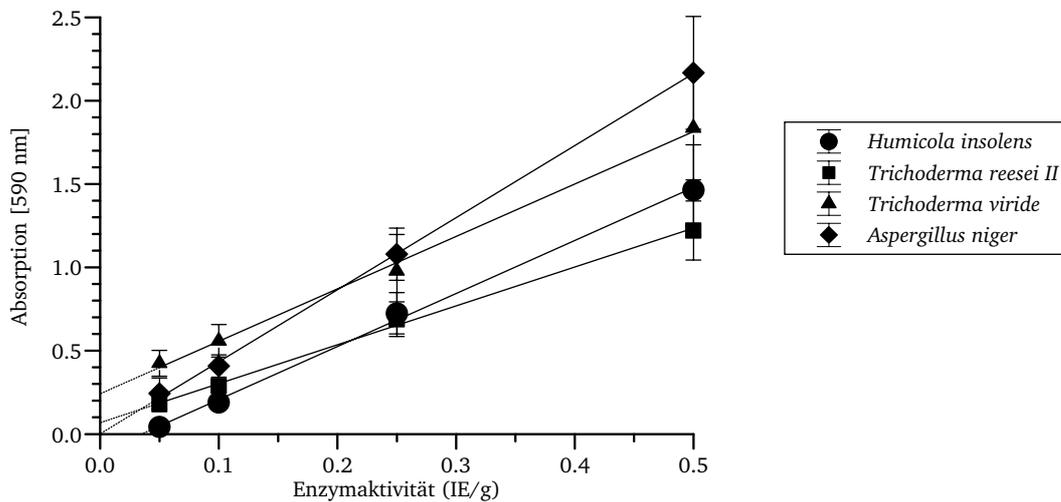


Abbildung 51: Standardkurven verschiedener Enzympräparate in 20 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0, Bestimmung der Enzymaktivität auf β -Glucan, kommerzielle Glucazymetabletten (Megazyme, Irland)

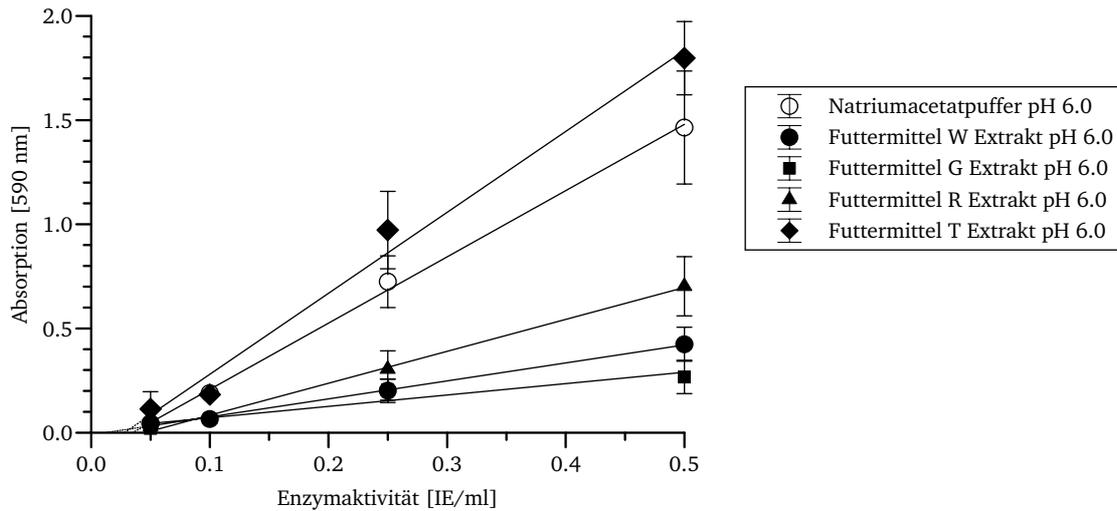


Abbildung 52: Einfluß von verschiedenen Futtermittelextrakten auf die Enzymaktivitätsbestimmung von Enzympräparat Biopract® (*T. reesei II*) mit kommerziellen Xylazymetabletten (Megazyme, Irland)

Tabelle 17: Steigung von Standardkurven der Aktivität auf Xylan von Enzympräparat Biopract® (*T. reesei II*) in verschiedenen Versuchsmatrices

Versuchsmatrix	Steigung
Natriumacetatpuffer	3,18
Futtermittel W	0,80
Futtermittel G	0,54
Futtermittel R	1,53
Futtermittel T	3,88

In Tabelle 17 sind die Steigungen der Standardkurven der Aktivitäten auf Xylan von Enzympräparat Biopract® (*T. reesei II*) in verschiedenen Futtermitteln dargestellt. Sie wurden am wenigsten von Triticale Futtermitteln und am stärksten durch Futtermittel G beeinflusst.

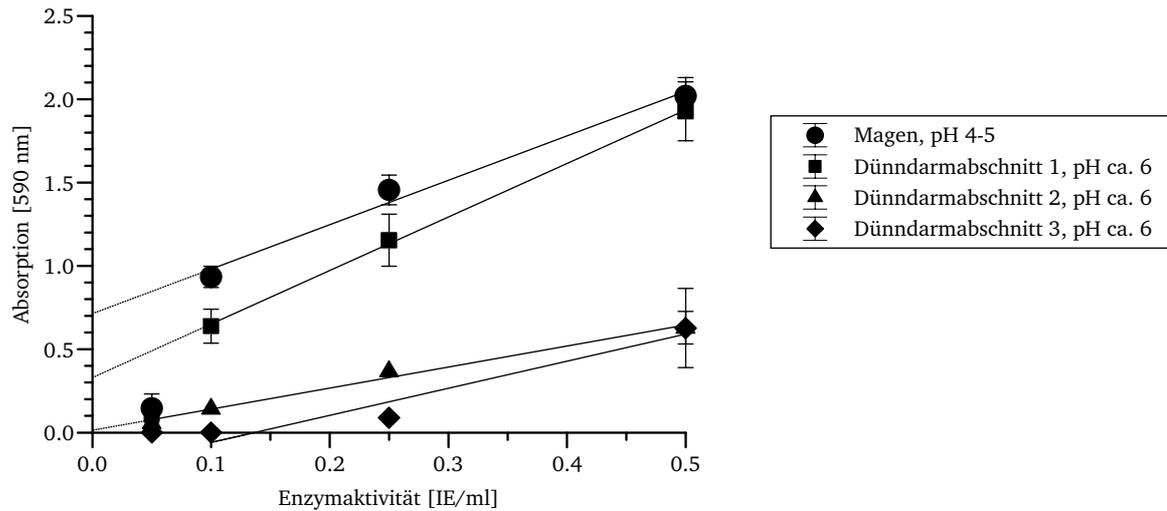


Abbildung 53: Einfluß von Ferkeldigesta-Überständen auf die Xylanasebestimmung mit chromogenen Xylazymetabletten (Megazyme, Irland), Enzympräparat Biopract® (*T. reesei II*)

Die Aktivitätsbestimmung von Enzympräparat Biopract® (*T. reesei II*) in Digesta-Proben (Abb. 53) zeigte, daß die Freisetzung von gefärbten Hydrolyseprodukten durch Digesta-Überstände von Ferkeln aus den Dünndarmabschnitten 2 und 3 beeinflusst wurde. Mageninhalt, von dem erwartet wurde, daß er wegen seines niedrigen pH-Wertes und der proteolytischen Aktivität die Enzymaktivität inhibiert, beeinflusste die Freisetzung von gefärbten Hydrolyseprodukten weniger, reduzierte jedoch die Enzymaktivitätsbestimmung auf einen Bereich von 0,1–0,5 IE/ml. Das gleiche galt für Dünndarmabschnitt 1. Die Standardkurven vom Enzympräparat in Dünndarmabschnitt 2 zeigten einen linearen Zusammenhang im Bereich von 0,05–0,5 IE/ml Überstand.

Tabelle 18: Extinktion nach der enzymatische Hydrolyse von verschiedenen Xylanderivaten mit Reaktivrot, Enzympräparat Lyxasan®, 540 nm, 0,5 mg/ml, 50°C

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
unbehandelt		0,1135	0,267	0,503	0,820	0,880	0,060
autoklaviert		0,0580	0,126	0,3045	0,011	0,037	0,051
ultraschallbehandelt		0,0200	0,030	0,041	0,075	0,248	0,249

Blindwert: chromogenes Substrat in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 o. Futtermittel A-Extrakt

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse von verschiedenen Xylanmodifikationen mit gekoppeltem Reaktivrot nach einer Inkubationszeit von 30 min dargestellt. Enzymaktivitäten in Natriumacetatpuffer konnten mit unbehandeltem und autoklaviertem Hafer-

spelzenxylylan als hydrolysierbare Komponente bestimmt werden. Für die Enzymaktivitätsbestimmung in Futtermittel A- und G-Extrakt eignete es sich nicht.

Tabelle 19: Extinktion nach enzymatischer Freisetzung von Reaktivrot aus verschiedenen Xylanderivaten, verschiedenen Substratkonzentrationen, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*) in Natriumacetatpuffer, 540 nm, 50°C, 3h

Substrat	0.5 mg/ml			20 mg/ml		
	0,1	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
Enzymaktivität [IE]						
unbehandelt	0,046	0,088	0,173	1,068	1,35	1,62
autoklaviert	0,081	0,098	0,250	1,087	1,45	1,68
ultraschallbehandelt	–	–	–	0,6	0,9	2,5

Blindwert: chromogenes Substrat und Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

Tabelle 19 zeigt, daß eine Erhöhung der chromogenen Substratkonzentration und eine Verlängerung der Inkubationszeit die Absorption durch freigesetzte Hydrolyseprodukte mit gekoppelten Reaktivrot erhöht. Zur Enzymaktivitätsbestimmung im Futtermittel-extrakt eignete sich chromogenes Substrat mit Reaktivrot nicht.

Tabelle 20: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse von Xylanderivaten mit Remazol Brilliant Blue, 0,5 mg/ml, 50°C, 0,5 h, 595 nm, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*)

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0		
	0,1	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
Enzymkonzentration [IE]						
unbehandelt	0,015	0,069	0,1860	0,0130	0,0260	0,0775
autoklaviert	0,088	0,162	0,3125	-0,0860	-0,1111	-0,1290
ultraschallbehandelt	0,249	0,325	0,4230	0,0100	0,0075	0,0460

Blindwert: chromogenes Substrat und Natriumacetatpuffer bzw. Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0

In Tabelle 20 werden die Extinktionen der enzymatischen Freisetzung von Hydrolyseprodukten mit Remazol Brilliant Blue (RBB) durch das Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*) in Futtermittel-extrakt bzw. Natriumacetatpuffer gegenüber dem entsprechenden Blindwert aufgeführt. Es wurden 0,5 mg/ml Substrat verwendet und 30 min bei 50°C inkubiert. Mit Enzympräparat in Natriumacetatpuffer wurden bei Verwendung von unbehandeltem, autoklaviertem und ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylylan gegenüber dem Blindwert steigende Extinktionen entsprechend der Enzymkonzentration erhalten. Die Extinktionswerte waren beim unbehandelten und autoklavierten Substrat sehr niedrig. Deutlich höher waren sie nur beim ultraschallbehandeltem Substrat. Im Futtermittel A-Extrakt wurden nur bei der Hydrolyse von chromogenen Substrat mit unbehandeltem Haferspelzenxylylan den Enzymkonzentrationen entsprechende Ab-

sorptionen erhalten. Die Hydrolyse des ultraschallbehandelten Substrates zeigte keinen Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Extinktion, die Hydrolyse des autoklavierten Substrats lieferte gegenüber dem Blindwert eine negative Extinktion.

Tabelle 21: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse von Xylanderivaten mit Remazol Brilliant Blue, 6 mg/ml, 50°C, Inkubationszeit 3h, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*), 595 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
unbehandelt		0,044	0,123	0,091	n.a.	n.a.	n.a.
autoklaviert		0,022	0,044	0,188	-0,086	-0,165	-0,042
ultraschallbehandelt		0,169	0,26	0,192	-0,071	-0,079	-

Blindwert: chromogenes Substrat und Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 bzw. Futtermittel A-Extrakt, n.a. = nicht auswertbar, die Extinktionswerte lagen bei Null

Eine Erhöhung der Substratkonzentration von 0,5 mg auf 6 mg und die Verlängerung der Inkubationszeit von 0,5 h auf 3 h führte bei der enzymatischen Hydrolyse von unbehandeltem, autoklaviertem und ultraschallbehandeltem Haferspelzenxyylan mit RBB in Natriumacetatpuffer zu Extinktionen, die keinen Zusammenhang zur eingesetzten Enzymkonzentration zeigten. Im Futtermittel A-Extrakt lagen die Extinktionswerte nach der Hydrolyse von unbehandeltem Haferspelzenxyylan nahe 0; beim autoklavierten und unbehandelten Haferspelzenxyylan lagen gegenüber dem Blindwert negative Extinktionen ohne Zusammenhang zur Enzymkonzentration vor (Tab. 21).

Tabelle 22: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse verschiedener Xylanderivate mit RBB, 20 mg/ml, 50°C, 3h, Enzympräparat Lyxasan®, 595 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
unbehandelt		0,420	0,476	0,497	-0,082	-0,111	-0,129
autoklaviert		0,127	0,228	0,742	-0,158	-0,102	-0,129
ultraschallbehandelt		0,138	0,265	0,138	-0,066	-0,068	-0,054
carboxymethyliert		0,500	0,799	1,499	n.a.	n.a.	n.a.

Blindwert: chromogenes Substrat und Natriumacetatpuffer bzw. Futtermittel A-Extrakt, n.a. = nicht auswertbar, Extinktionswerte lagen bei Null

Die Verwendung einer Substratkonzentration von 20 mg/ml zur Enzymaktivitätsbestimmung in Natriumacetatpuffer führte gegenüber dem entsprechenden Blindwert zu höheren Extinktionen. Ein Zusammenhang zwischen Extinktion und Enzymkonzentration war nur beim carboxy-

methylierten und autoklavierten Xylan vorhanden. Im Futtermittel A-Extrakt wurden wieder negative Extinktionswerte gegenüber dem Blindwert erhalten (Tab. 22).

Die enzymatische Hydrolyse mit 20 mg/ml chromogenen Substrat wurde bei 30°C und 40°C mit einer Inkubationszeit von 1 h wiederholt. Die Bestimmung bei 30°C war nicht auswertbar, da die Extinktionswerte bei Null lagen. Zwischen der Hydrolyse bei 40°C und bei 50°C war kein wesentlicher Unterschied zu erkennen (ohne Abb.).

Die Abbildung 54 dokumentiert die enzymatische Freisetzung von Hydrolyseprodukten mit Reaktivgrün 19 aus verschiedenen Substraten. Es wurden 6 mg/ml und 20 mg/ml chromogenes Substrat eingesetzt. Bei beiden Substratkonzentrationen wurden aus dem unbehandeltem Haferspелzenxylan am wenigsten gefärbte Hydrolyseprodukte freigesetzt. Der Unterschied der Extinktion zwischen der Hydrolyse von 6 bzw. 20 mg/ml und autoklaviertem 6 mg/ml ultraschallbehandeltem Haferspелzenxylan war über den geprüften Konzentrationsbereich nicht bedeutend. Die höchsten Extinktionswerte wurden durch Hydrolyse von 20 mg/ml ultraschallbehandeltem Haferspелzenxylan erzielt.

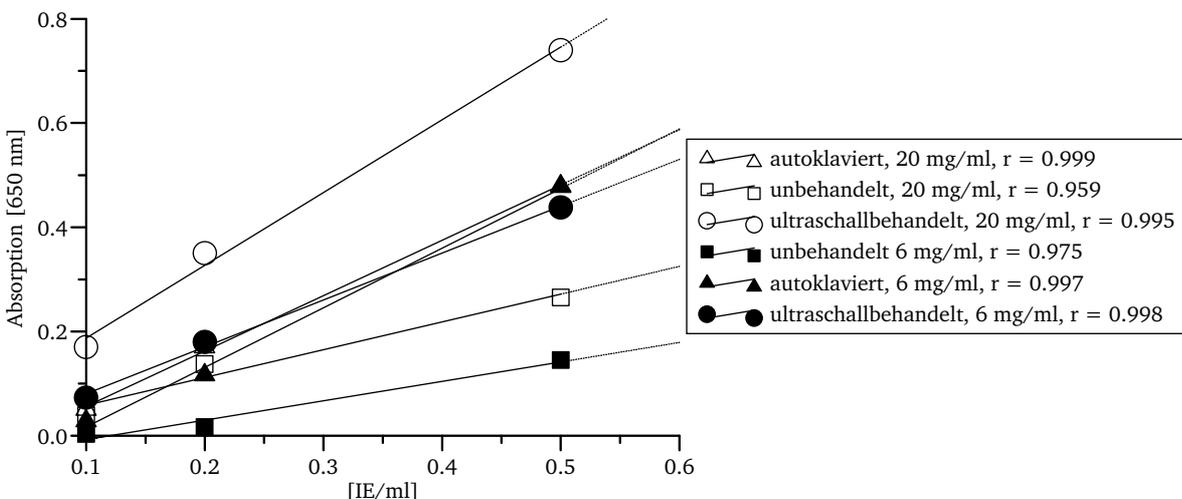


Abbildung 54: Chromogene Substrate, 6 mg/ml u. 20 mg/ml unbehandeltes, autoklaviertes, ultraschallbehandeltes Haferspелzenxylan mit Reaktivgrün, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger* I) in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

Die Inkubation der Substrate mit Enzympräparat Lyxasan® im Futtermittel A-Extrakt führten zu negativen Extinktionen gegenüber dem entsprechenden Blindwert. Die graphische Auftragung der negativen Extinktionswerte, die durch die enzymatische Hydrolyse von ultraschallbehandelten und unbehandelten Haferspелzenxylans mit Enzympräparat Lyxasan® im Futtermittel A-Extrakt zeigt einen linearen Zusammenhang zur Enzymkonzentration (Abb. 55). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch mit Inkubation in Futtermittel G-Extrakt (ohne Abb.) erzielt.

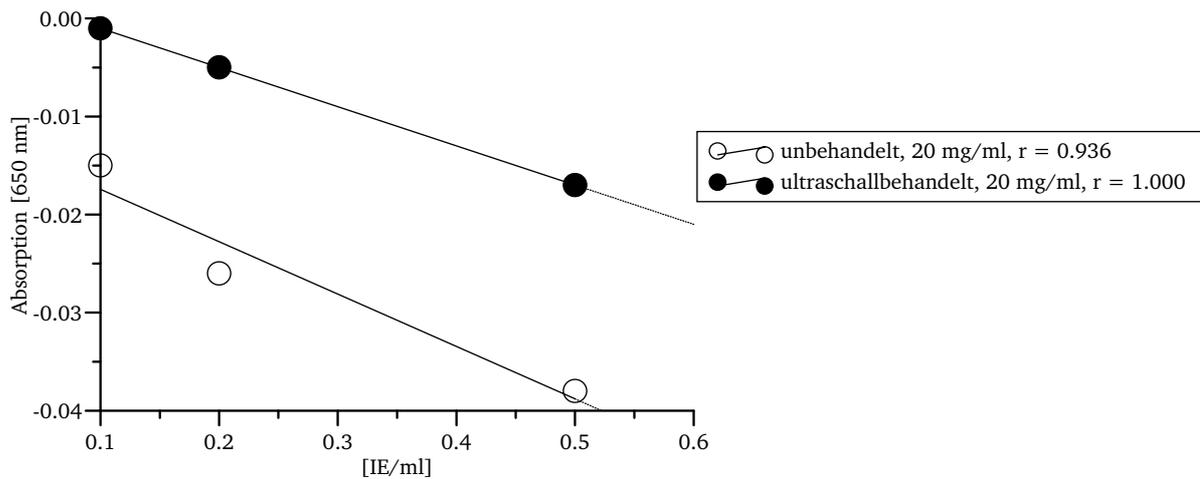


Abbildung 55: Chromogene Substrate, unbehandeltes und ultraschallbehandeltes Haferspelzenxyylan mit Reaktivgrün, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger* I) im Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0

Tabelle 23: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse verschieden behandelte Xylanderivate mit Reaktivorange, 0,5 mg/ml, 50°C, 0,5 h, 440 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
unbehandelt		0,021	0,044	0,620	0,018	0,019	0,099
autoklaviert		0,016	0,270	0,370	0,011	0,019	0,083
ultraschallbehandelt		0,086	0,103	0,142	0,004	0,017	0,027

Tabelle 24: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse verschieden behandelte Xylanderivate mit Reaktivorange, 6 mg/ml, 50°C, 3 h, 440 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5
unbehandelt		0,001	0,009	0,033
autoklaviert		0,005	0,011	0,027
ultraschallbehandelt		0,008	0,012	0,030

Tabelle 25: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse verschieden behandelter Xylanderivate mit Reaktivorange, 20 mg/ml, 50°C, 3 h, 440 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
unbehandelt		0,061	0,116	0,219	-0,061	-0,209	-0,797
autoklaviert		0,146	0,169	0,463	-0,071	-0,118	-1,457
ultraschallbehandelt		0,135	0,781	1,877	-0,106	-0,145	-0,138

Der Farbstoff Reaktivorange (Tab. 23–25) eignete sich für die Detektion von Enzympräparat Lyxasan® in Natriumacetatpuffer. Mit 20 mg/ml chromogenen Substrat wurden nach 3 h Inkubation bei 50°C gegenüber dem entsprechenden Blindwert höhere Extinktionen (Tab. 25) als mit 6 mg/ml erzielt (Tab. 24). Die Extinktionen die mit 0,5 mg/ml Substrat erhalten wurden, zeigten einen Zusammenhang zu den steigenden Enzymkonzentrationen, waren aber sehr niedrig (Tab. 23). Die höchsten Extinktionen wurden mit einer Konzentration von 20 mg/ml chromogenen Substrat aus ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylylan und Reaktivorange erhalten (Tab. 25).

In Futtermittel A-Extrakt (Tab. 23) wurden nach 30 min Inkubation von 0,5 mg/ml Substrat mit Enzympräparat Lyxasan® gegen über dem Blindwert höhere Extinktionen erhalten. Die Extinktionen die durch die Hydrolyse von ultraschallbehandelten Haferspelzenxylylan mit Reaktivorange erhalten wurden, zeigten dabei einen linearen Zusammenhang. Höhere negative Extinktionswerte gegenüber dem Blindwert wurden durch die Hydrolyse von 20 mg/ml unbehandeltem und autoklaviertem Haferspelzenxylylan mit Reaktivorange in Futtermittlextrakt erhalten (Tab. 25).

Chromogene Substrate mit Reaktivgelb waren für die Bestimmung von Enzymaktivität in Natriumacetatpuffer geeignet (Tab. 26–28). Die höchsten Absorptionen wurden durch Hydrolyse von 0,5 mg/ml ultraschallbehandelten Haferspelzenxylylan mit Reaktivgelb erzielt. Die Absorptionen nach der Hydrolyse von 0,5 IE/ml unbehandelten Haferspelzenxylylan mit Reaktivgelb waren geringer. Sie entsprachen den Enzymkonzentrationen.

Im Futtermittel A-Extrakt wurde zwischen der Enzymkonzentration und Extinktion mit unbehandeltem Haferspelzenxylylan als hydrolysierbare Komponente ein negativer linearer Zusammenhang erhalten. Die Daten, die mit autoklaviertem Haferspelzenxylylan als hydrolysierbarer Komponente erhalten wurden, waren nicht auswertbar, mit ultraschallbehandeltem wurde ein positiver linearer Zusammenhang mit niedrigen Extinktionen (Tab. 26) erhalten.

Tabelle 26: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse verschiedener Xylanderivate mit Reaktivgelb, 0,5 mg/ml, 50°C, 0,5 h, 420 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
unbehandelt		0,052	0,079	0,144	-0,078	-0,122	-0,144
autoklaviert		0,012	0,003	0,027	0,031	0,054	0,032
ultraschallbehandelt		0,024	0,051	0,353	0,012	0,073	0,099

Nach 3 h Inkubation von 6 mg/ml Substrat wurden die höchsten Extinktionen mit dem ultraschallbehandelten Haferspelzenxylylan als Substrat mit Enzympräparat in Natriumacetatpuffer erzielt. Es lag ein linearer Zusammenhang über den geprüften Meßbereich vor. Die Extinktion nach der Hydrolyse von unbehandeltem und autoklavierten Haferspelzenxylylan mit 0,5 IE/ml Lyxasan® war ebenfalls hoch, aber es gab keinen linearen Zusammenhang über den geprüften Meßbereich (Tab. 27).

Tabelle 27: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse verschiedener Xylanderivate mit Reaktivgelb, 6 mg/ml, 50°C, 3 h, 420 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5
unbehandelt		0,046	0,064	0,165
autoklaviert		0,052	0,064	0,335
ultraschallbehandelt		0,115	0,217	0,345

Die höchsten Extinktionen wurden durch Hydrolyse von 20 mg/ml ultraschallbehandelten und unbehandeltem Haferspelzenxylylan mit Reaktivgelb als chromogener Komponente erzielt (Tab. 28). Die Extinktionen entsprachen den Enzymkonzentrationen.

Tabelle 28: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse verschiedener Haferspelzenxylylanderivate mit Reaktivgelb, 20 mg/ml, 50°C, 3 h, 420 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5
unbehandelt		0,172	0,502	0,803
autoklaviert		0,150	0,325	0,464
ultraschallbehandelt		0,450	0,570	0,670

Tabelle 29: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse verschiedener Xylanderivate mit Azurin A, 20 mg/ml, 3 h, 50°C, 600 nm

Substrat Haferspelzenxylylan	Enzympräparat Lyxasan® in Natriumacetatpuffer pH 6,0				
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,2	0,5	1
unbehandelt		0,045	0,084	0,126	0,171
autoklaviert		0,887	0,718	0,449	0,059
ultraschallbehandelt		0,013	0,030	0,084	0,142
monocarboxymethyliert		0,033	0,054	0,075	0,113
dicarboxymethyliert		0,006	0,056	0,110	0,060
maximal carboxymethyliert		0,032	0,050	0,120	0,042
ultraschallbehandelt u. carboxymethyliert		0,020	0,100	0,110	0,700

Die enzymatische Freisetzung von Hydrolyseprodukten mit Azurin A durch Enzympräparat Lyxasan® in Natriumacetatpuffer zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen Extinktion und Enzymkonzentration bei der Hydrolyse von unbehandelten, ultraschallbehandelten und ultraschallbehandelten und carboxymethylierten Haferspelzenxylylan. Die letztere zeigte die höchsten Extinktionswerte (Tab. 29).

Hydrolysen mit Lyxasan® in Futtermittel A-Extrakt führten gegenüber dem Blindwert zu negativen Extinktionen, die bis auf die Hydrolysen von ultraschallbehandeltem und carboxymethylierten Haferspelzenxylylan keinen linearen Zusammenhang über den geprüften Konzentrationsbereich erkennen ließen (Tab. 30).

Tabelle 30: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse verschieden behandelter Xylanderivate mit Azurin A, 20 mg/ml, 3h, 50°C, 600 nm

Substrat	Enzympräparat Lyxasan® in Futtermittel A-Extrakt pH 6,0				
	Enzymkonzentration [IE]	0.1	0.2	0.5	1
unbehandelt		-0,043	-0,069	-0,118	-0,083
autoklaviert		-0,075	-0,158	-0,362	-0,241
ultraschallbehandelt		-0,029	-0,061	-0,071	-0,006
monocarboxymethyliert		-0,017	-0,040	-0,062	-0,030
dicarboxymethyliert		-0,003	-0,071	-0,115	-0,055
maximal carboxymethyliert		-0,028	-0,047	-0,156	-0,048
ultraschallbehandelt u. carboxymethyliert		-0,036	-0,125	-0,178	-0,607

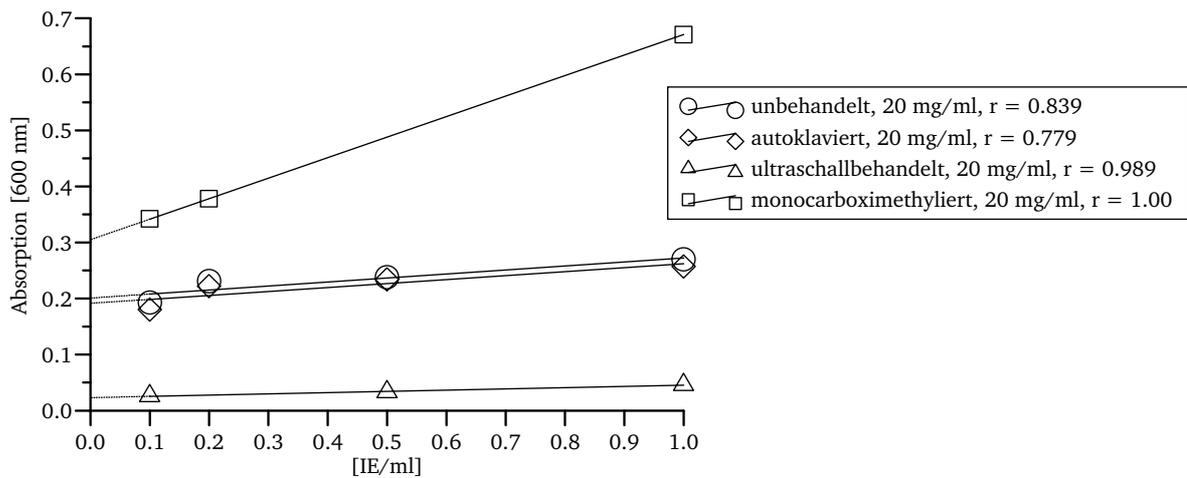


Abbildung 56: Chromogene Substrate, unbehandeltes, autoklaviertes, monocarboxymethyliertes und ultraschallbehandeltes Haferspelzenxylan mit Azurin B, Enzympräparat Lyxasan® in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

Die hydrolytische Freisetzung von Azurin B durch Enzympräparat Lyxasan® in Natriumacetatpuffer lieferte mit allen hydrolysierbaren Substratkomponenten positive Extinktionen und einen linearen Zusammenhang zur Enzymkonzentration. Hohe Extinktionsdifferenzen gegenüber dem Blindwert und damit ein großer Meßbereich (Konzentrationsbereich von 0,1 IE/ml bis 1 IE/ml) wurde nur mit monocarboxymethyliertem Haferspelzenxylan erzielt (Abb. 56).

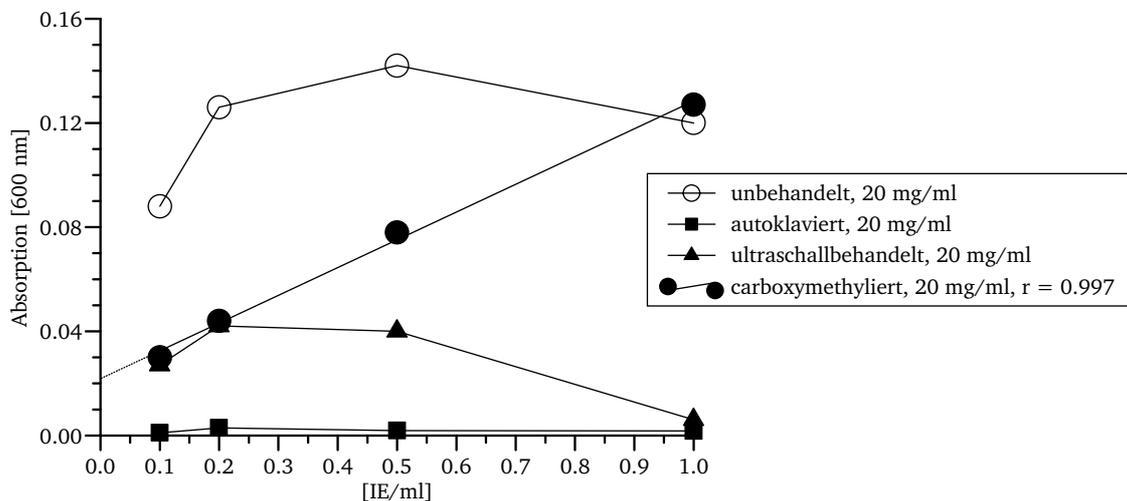


Abbildung 57: Chromogene Substrate, unbehandeltes, autoklaviertes, carboxymethyliertes und ultraschallbehandeltes Haferspelzenxylan mit Azurin B, Enzympräparat Lyxasan® im Futtermittel A-Extrakt pH 6,0

In Futtermittel A-Extrakt wurde nur mit dem carboxymethyliertem Haferspelzenxylan als hydrolysierbarer Komponente ein linearer Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Extinktion über den Konzentrationsbereich von 0,1 IE/ml bis 1 IE/ml erhalten (Abb. 57).

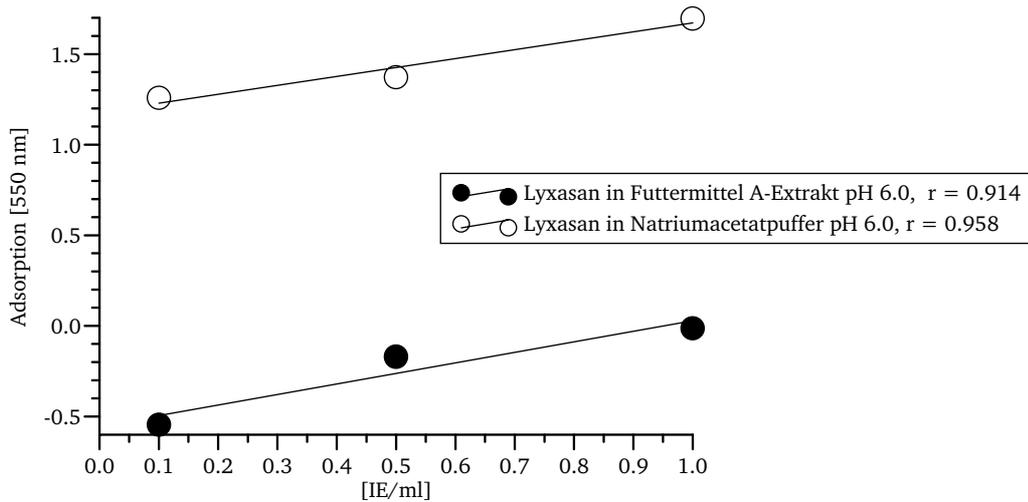


Abbildung 58: Chromogene Substrate, carboxymethyliertes Haferspelzenxyylan mit Reaktivviolett, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger* I) in Natriumacetatpuffer und Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0

Mit Reaktivviolett als chromogener und Carboxymethylxyylan als hydrolysierbare Substratkomponente wurde bei der Aktivitätsbestimmung von Enzympräparat Lyxasan® in Natriumacetatpuffer positive Extinktionen erhalten. Im Futtermittel A-Extrakt waren die Extinktionen bezogen auf den Blindwert negativ, zeigten aber einen linearen Zusammenhang zwischen Extinktion und Enzymkonzentration. In Natriumacetatpuffer war die Differenz zwischen der Extinktion bei 0,1 IE/ml und 0,5 IE/ml gering. Im Futtermittel A-Extrakt war die Extinktion bei 0,1 IE/ml niedrig und bei 1 IE/ml hoch (Abb. 58). Die Verschiebung des Blindwertes im Natriumacetatpuffer wurde im Futtermittlextrakt kompensiert.

Tabelle 31: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse monocarboxymethylierten Xylans mit Reaktivschwarz, 20 mg/ml, 3 h, 50°C, 600 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
monocarboxymethyliert		0,038	0,058	0,084	-0,011	-0,01	-0,006

Mit Reaktivschwarz gekoppelten monocarboxymethyliertem Haferspelzenxyylan wurden durch Hydrolyse in Natriumacetatpuffer mit Enzympräparat Lyxasan® niedrige positive Extinktionen erhalten. Im Futtermittel A-Extrakt wurden negative Extinktionen erhalten, die keinen Zusammenhang zur Enzymkonzentration darstellten (Tab. 31).

Tabelle 32: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse monocarboxymethylierten Xylans mit Basilinblue E3G, 20 mg/ml, 3 h, 50°C, 650 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0			
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
monocarboxymethyliert		0,17	0,221	0,282	-0,041	-0,147	-0,112

Tabelle 33: Extinktion nach enzymatischer Hydrolyse monocarboxymethylierten Xylans mit Cibacron Blue 3GA, 20 mg/ml, 3 h, 50°C, 650 nm

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0			Futtermittel A-Extrakt pH 6,0		
	Enzymkonzentration [IE]	0,1	0,5	1	0,1	0,5
monocarboxymethyliert	0,23	0,241	0,357	-0,065	-0,044	-0,02

Die Tabellen 32 und 33 zeigen die Absorptionen, die durch enzymatischen Freisetzung von Hydrolyseprodukten mit Cibacron Blue 3 GA bzw. Basinlinblue E3G als chromogener Komponente, gemessen wurden. Im Futtermittel A-Extrakt führte die Hydrolyse beider chromogenen Substrate zu negative Extinktionen, die keinen Zusammenhang mit der Enzymkonzentration erkennen ließen.

Im folgenden werden die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse von den chromogenen Substraten mit dem kationischen Farbstoff Rutheniumrot und den anionischen Farbstoffen gezeigt. Abbildung 59 zeigt die hydrolytische Freisetzung von dem Kation Rutheniumrot aus dem Komplex Rutheniumrotkation und Carboxymethylxylan durch das Enzympräparat Lyxasan® in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0. Bei Verwendung von chromogenem Substrat mit ultraschallbehandelten und carboxymethylierten Haferspелzenxylan als hydrolysierbarer Komponente wurden deutlich höhere Extinktionen, als mit carboxymethyliertem, aber nicht ultraschallbehandelten Haferspелzenxylan erhalten. Es wurde durch enzymatische Hydrolyse mehr farbiges Kation freigesetzt.

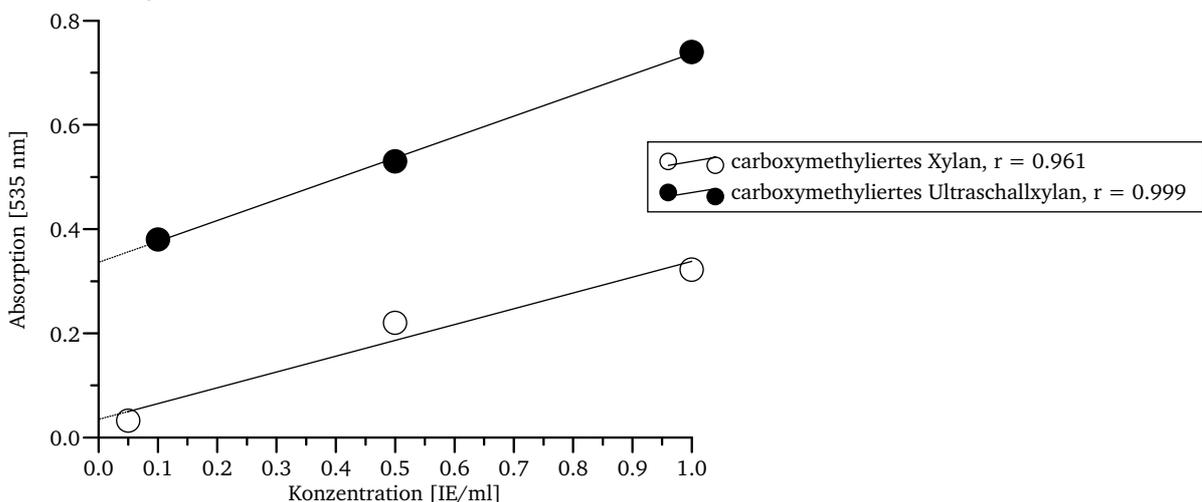


Abbildung 59: Chromogene Substrate, carboxymethyliertes unbehandeltes und ultraschallbehandeltes carboxymethyliertes Haferspелzenxylan mit Rutheniumrot, Enzympräparat Lyxasan® in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0

Die Extinktionen, die aus enzymatischer Hydrolyse des Rutheniumrot-Carboxymethylxylankomplex im Futtermittel-extrakt (Abb. 60) erhalten wurden, waren kleiner als der Blindwert und da-

mit negativ. Sie ließen einen quadratischen Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Extinktion zu erkennen.

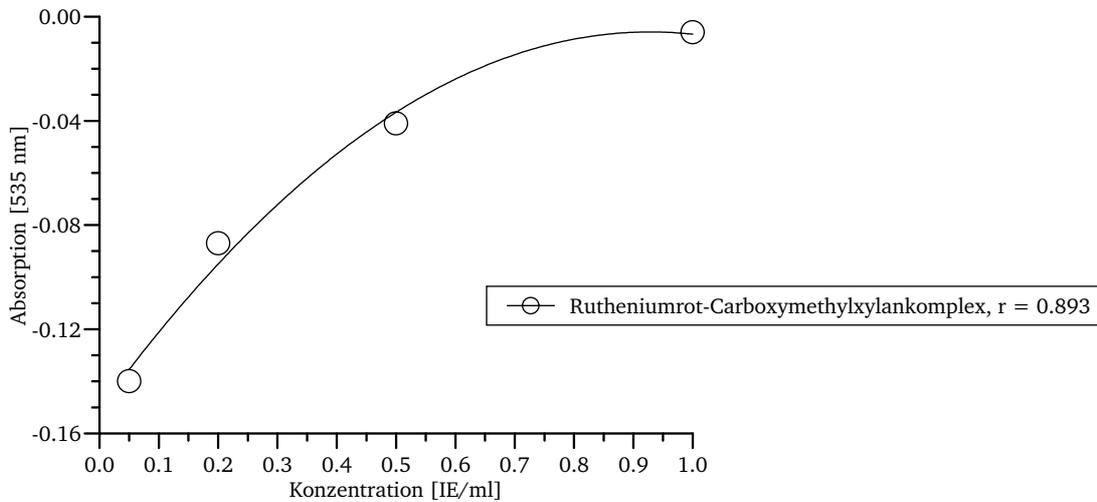


Abbildung 60: Chromogene Substrate, carboxymethyliertes ultraschallbehandeltes Haferspelzenxylan mit Rutheniumrot, Enzympräparat Lyxasan[®] im Futtermittel A-Extrakt

Die Hydrolyse von chromogenen Substraten aus ionischen Farbstoffen und hydrolysierbaren Substrat war nur als Zeitverlaufsmessung direkt im Photometer möglich, da ein Stoppen der enzymatischen Reaktion und Ausfällen des nichthydrolysierten, hochmolekularen Xylans durch Ethanolzugabe das Gleichgewicht zwischen dem ionisch an das Substrat gebundenen Farbstoff und dem gelösten Farbstoff dadurch verschiebt, daß gebundener Farbstoff in dem Ethanol-Wasser-Gemisch gelöst wird.

Die Kopplungsreaktion von Kongorot mit autoklaviertem Haferspelzenxylan führte zu zwei Produkten. Ein Produkt (autoklaviert I) fiel bei der Zugabe von Kongorot sofort aus, das andere (autoklaviert II) fiel erst nach Zugabe von Isopropanol aus.

Tabelle 34 zeigt die Extinktionen der enzymatischen Hydrolyse von verschiedenen Haferspelzenxylanderivaten mit Kongorot als chromogener Komponente. Die photometrischen Messungen wurden gegen 20 mM Natriumacetatpuffer als Blindwert durchgeführt. Es wurde je nach Substrat jeweils die Wellenlänge gewählt, bei welcher die höchste Absorption erhalten wurde. Mit Enzympräparat Lyxasan[®] in Natriumacetatpuffer war die Freisetzung von Kongorot innerhalb von 30 min bei Verwendung von dem ultraschallbehandelten und carboxymethylierten, autoklavierten (I) und ultraschallbehandelten Xylan hoch (Absorption von 0,83–0,97). Mit dem autoklavierten Haferspelzenxylan (II) wurde nur eine Absorptionsdifferenz von 0,49 erhalten.

Im Futtermittel A-, Weizen- und Gerste-Extrakt war die Absorptionsdifferenz vom enzymatisch freigesetzten Farbstoff zum Blindwert nur bei Verwendung von ultraschallbehandelten Hafer-

spelzenxylylan relativ hoch. Mit dem ultraschallbehandelten und carboxymethyliertem Haferspelzenxylylan wurden geringe Extinktionen erhalten. Die Absorptionen, die nach der Hydrolyse der autoklavierten Substraten (I u. II) erhalten wurden, waren nicht auswertbar. Die Absorptionen, die durch Hydrolyse mit niedrigeren Enzymkonzentrationen als 0,5 IE/ml in Natriumacetatpuffer und in den Futtermittlextrakten A und G erhalten wurden, waren niedrig, nicht reproduzierbar und ließen keinen Zusammenhang zwischen den Absorptionen und den Enzymkonzentrationen erkennen. In Futtermittel G-Extrakt war mit diesem chromogenen Substrat überhaupt keine Enzymaktivitätsbestimmung über den geprüften Konzentrationsbereich möglich, da viele Parallelbestimmungen sehr stark streuten.

Tabelle 34: Extinktion nach enzymatischer Freisetzung von Kongorot, verschiedene Haferspelzenxylylanderivate, 0,5 IE/ml Lyxasan® (*A. niger I*) in verschiedenen Matrices, pH 6,0

Substrat	Wellenlänge [nm]	Natrium- acetatpuffer	Futtermittel A-Extrakt	Weizen- Extrakt	Gersten- Extrakt
ultraschallbehandelt u. carboxymethyliert	498	0,831	0,168	0,017	0,194
autoklaviert I (fällt ohne Isopropanol aus)	500	0,976	–	–	–
autoklaviert II	508	0,496	–	–	–
ultraschallbehandelt	498	0,942	0,345	0,308	0,085

Blindwert: 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0, Inkubationszeit 30 min

Chromogene Substrate aus Brilliant Yellow und unbehandeltem, autoklaviertem, ultraschallbehandeltem und carboxymethyliertem und ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylylan wurden zur Enzymaktivitätsbestimmung von Lyxasan® verwendet. Das chromogene Substrat mit dem ultraschallbehandelten Haferspelzenxylylan wurde in 2 Verdünnungen (1:30 u. 1:100) eingesetzt, da sonst der lineare Bereich des Lambert-Beerschen Gesetzes überschritten worden wäre.

Tabelle 35 zeigt die Absorptionen von enzymatisch freigesetztem Brilliant Yellow gegen einen Blindwert aus dem entsprechenden chromogenen Substrat in 20 mM Natriumacetatpuffer, in Futtermittel A- oder G-Extrakt, jeweils bei pH 6,0. In Natriumacetatpuffer und Futtermittlextrakt wurden nur mit unbehandeltem Haferspelzenxylylan hohe Absorptionen erhalten. Die Hydrolyse von chromogenem Substrat aus Brilliant Yellow mit ultraschallbehandeltem und carboxymethyliertem Xylan lieferte in Natriumacetatpuffer höhere Extinktionen als in Futtermittel A-Extrakt. Mit autoklaviertem Haferspelzenxylylan wurden bei beiden Enzymkonzentrationen (0,1 u. 0,5 IE/ml) in Natriumacetatpuffer und in Futtermittel A-Extrakt niedrige, den Enzymkonzentrationen entsprechende Extinktionen erhalten. Mit dem 1:30 verdünnten ultraschallbe-

handeltem Haferspelenxylan mit Brilliant Yellow wurde nur durch die Hydrolyse mit der höheren Enzymkonzentration (0,5 IE/ml) in Natriumacetatpuffer und Futtermittel A-Extrakt eine meßbare Extinktion erhalten. Mit der 1:100 verdünnten chromogenen Substratlösung wurde nur in Natriumacetatpuffer etwas Brilliant Yellow hydrolytisch freigesetzt. Die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse in Futtermittel G-Extrakt waren wegen starker Streuung in den Parallelproben nicht auswertbar.

Tabelle 35: Extinktion nach enzymatischer Freisetzung von Brilliant Yellow, verschiedene Haferspelenxylanderivate, 0,5 bzw. 0,1 IE Lyxasan® (*A. niger I*) in verschiedenen Matrices

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0		Futtermittel A-Extrakt pH 6,0	
	0,1	0,5	0,1	0,5
Enzymkonzentration [IE]				
unbehandelt	0,530	0,760	0,770	1,570
autoklaviert	0,063	0,093	0,016	0,086
ultraschallbehandelt u. carboxymethyliert	0,128	0,162	0,707	0,750
ultraschallbehandelt 1:30	–	0,110	–	0,081
ultraschallbehandelt 1:100	–	0,093	–	–

Blindwert: chromogenes Substrat und Natriumacetatpuffer bzw. Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0

Mit Trypanblau wurde dicarboxymethyliertes, ultraschallbehandeltes und unbehandeltes Haferspelenxylan zu chromogenen Substraten kombiniert. Die chromogenen Substrate mit Trypanblau hatten zwei Absorptionsmaximae (315 und 600 nm).

Tabelle 36: Extinktion nach enzymatischer Freisetzung von Trypanblau, verschiedene Haferspelenxylanderivate, 0,5 bzw. 0,1 IE Lyxasan®

Substrat	Wellenlänge [nm]	Natriumacetatpuffer		Futtermittel A-Extrakt	
		pH 6,0	pH 6,0	pH 6,0	pH 6,0
Enzymkonzentration [IE]		0,1	0,5	0,1	0,5
dicarboxymethyliert	315	0,682	0,709	0,702	0881
ultraschallbehandelt	315	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
unbehandelt	315	0,268	0,327	n. a.	n. a.
dicarboxymethyliert	600	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
unbehandelt	600	0,235	0,523	0,03	0,036
ultraschall behandelt	600	0,323	0,365	0,248	0,003

Blindwert: chromogenes Substrat und Natriumacetatpuffer bzw. Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0, n.a. = nicht auswertbar, Inkubationszeit 30 min

In Tabelle 36 werden die Extinktionen von enzymatisch aus verschiedenen Substraten freigesetztem Trypanblau gegen einen Blindwert aus dem entsprechenden chromogenen Substrat in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 bzw. Futtermittel A-Extrakt gezeigt. Hohe Extinktionen nach der Hydrolyse mit Enzympräparat Lyxasan® in Natriumacetatpuffer und in Futtermittel A-Extrakt bei verschiedenen Enzymkonzentrationen gab es mit dicarboxymethyliertem Haferspelzenxylylan als hydrolysierbaren Substrat bei 315 nm, aber die Extinktionsunterschiede zwischen den beiden Enzymkonzentrationen waren gering (0,027 in Natriumacetatpuffer, 0,079 in Futtermittel A-Extrakt). Aus dem chromogenen Substrat mit unbehandeltem Haferspelzenxylylan wurde durch enzymatische Hydrolyse in Natriumacetatpuffer weniger als die Hälfte an Farbstoff freigesetzt, als aus dem entsprechenden Substrat mit dicarboxymethyliertem Haferspelzenxylylan. Alle Extinktionen die im Futtermittlextrakt mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylylan als hydrolysierbare Komponente bei 315 nm aufgenommen wurden, waren nicht auswertbar, da die Streuung bei vielen Parallelproben sehr groß war.

Die Hydrolyse des chromogenen Substrats aus von unbehandeltem Haferspelzenxylylan mit Trypanblau und anschließende Messung bei 600 nm führte nur in Natriumacetatpuffer zu brauchbaren Extinktionen für beide Enzymkonzentrationen, in Futtermittel A-Extrakt waren die Extinktionsunterschiede (0,006) zwischen den beiden Enzymkonzentrationen zu niedrig und damit unbrauchbar. Die Absorptionsunterschiede zwischen den beiden Enzymkonzentrationen, die nach der Hydrolyse von chromogenen Substrat mit ultraschallbehandeltem Xylan im Natriumacetatpuffer gemessen wurden waren geringer als nach der Hydrolyse von chromogenen Substrat mit unbehandeltem Haferspelzenxylylan, im Futtermittel A-Extrakt entsprach die Höhe der Extinktionen nicht den Enzymkonzentrationen. Die Extinktionen, die mit dem dicarboxymethylierten Haferspelzenxylylan als hydrolysierbare Komponente erzielt wurden, waren nicht auswertbar, da viele Parallelbestimmungen sehr streuten.

Calcufluor wurde mit unbehandeltem, autoklavierten, ultraschallbehandeltem, ultraschallbehandeltem und carboxymethyliertem, dicarboxymethyliertem Haferspelzenxylylan zu chromogenen Substraten kombiniert. Tabelle 37 zeigt die Absorptionen von enzymatisch aus verschiedenen Haferspelzenxylylanderivaten freigesetztem Calcufluor gegen einen Blindwert aus dem entsprechenden chromogenen Substrat in 20 mM Natriumacetatpuffer und Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0. In Natriumacetatpuffer war die Extinktion bei unbehandeltem Xylan hoch, die Extinktionsdifferenz zwischen den beiden Enzymkonzentrationen klein (0,026). Im Futtermittlextrakt war nur bei der hohen Enzymkonzentration (0,5 IE/ml) eine geeignete Extinktion meßbar. Mit ultraschallbehandeltem bzw. autoklaviertem Haferspelzenxylylan wurden niedrige Extinktionen bei beiden Enzymkonzentration erzielt. Im Futtermittel A-Extrakt war nur eine Extinktion bei hoher Enzymkonzentration auswertbar. Nach der Hydrolyse von dicarboxymethyliertem

Haferspelzenxylan mit Calcufluor war die Absorption im Natriumacetatpuffer hoch und die Differenz (0,169) zwischen den beiden Enzymkonzentration deutlich groß. Im Futtermittel A-Extrakt waren die Extinktionen bei 0,5 IE/ml und bei 0,1 IE/ml nicht auswertbar.

Tabelle 37: Extinktion nach enzymatischer Freisetzung von Calcufluor, verschiedene Xylanderivate, 0,5 bzw. 0,1 IE Lyxasan®

Substrat	Natriumacetatpuffer pH 6,0		Futtermittel A-Extrakt pH 6,0	
	0,1	0,5	0,1	0,5
Enzymkonzentration [IE/ml]				
unbehandelt	0,412	0,438	n.a.	0,136
autoklaviert	0,084	0,127	n.a.	0,119
ultraschallbehandelt	0,030	0,117	n.a.	0,090
ultraschallbehandelt u. carboxymethyliert	0,006	0,252	0,064	0,239
dicarboxymethyliert	0,432	0,601	n.a.	0

Blindwert: chromogenes Substrat und 20 mM Natriumacetatpuffer bzw. Futtermittel A-Extrakt bei pH 6,0,
n.a. = nicht auswertbar

Die Hydrolyse des ultraschallbehandelten und carboxymethylierten Haferspelzenxylans mit Calcufluor führte sowohl im Natriumacetatpuffer als auch im Futtermittel A-Extrakt zu niedrigen, den Enzymkonzentrationen entsprechende Absorptionen. In Futtermittel G-Extrakt war keine Enzymaktivitätsbestimmung möglich, da die Extinktionen durch die starke Streuung von Parallelproben nicht auswertbar waren.

5.2.3.1 Vergleich der chromogenen Substrate

Mit allen Produkten aus modifizierten Haferspelzenxylanen und Reaktivfarbstoffen ließen sich Enzymaktivitäten in Natriumacetatpuffer bestimmen, wobei ein lösliches Substrat, wie das ultraschallbehandelte bzw. das monocarboxymethylierte Xylan wegen der besseren Löslichkeit von Vorteil war. Die Extinktionen waren unterschiedlich hoch. Im Futtermittellextrakt lieferte nur das carboxymethylierte Haferspelzenxylan mit Azurin B positive Extinktionen zum Blindwert (Abb. 57). Dieses Substrat wird von der Fa. Megazyme kommerziell hergestellt. Mit den anderen Reaktivfarbstoffen, Rutheniumrot und den anionischen Farbstoffen wurden negative Extinktionen zum Blindwert erhalten, die teilweise keinen Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Extinktion zeigten, aber zum Teil einen linearen Zusammenhang zwischen Substrat-Farbstoff und Enzymkonzentration erkennen ließen. Veränderte Reaktionszeiten (0,5 h, 1 h) und veränderte Temperaturen (40°C, 30°C) änderten daran praktisch nichts. In Tabelle 38 sind die Meßbereiche und Detektionsgrenzen der chromogenen Substrate aufgeführt, die praktisch zur Enzymaktivitätsbestimmung in verschiedenen Versuchsmatrices einsetzbar sind.

Tabelle 38: Meßbereiche und Detektionsgrenzen von Enzymaktivitäten auf Xylan und β -Glucan, bestimmt über chromogene Substrate in verschiedenen Matrices

Versuchsmatrix	Detektionsgrenze [IE/ml]	Meßbereich* (Extinktion)	Abbildung Nr.
Glucazymetabletten			
Natriumacetatpuffer pH 6,0	0,05	2,00	51
Xylazymetabletten			
Natriumacetatpuffer pH 6,0	0,05	2,00	52
Futtermittel Extrakt (B, W, T, R, G) pH 6,0	0,05	2,00	52
Digesta (Magen pH 4–5, Dünndarmabschnitt 3, pH ca. 6)	0,05	2,00	53
Digesta (Dünndarmabschnitt 1–2) pH ca. 6	0,10	2,00	53
Reaktivgrün 19 mit Haferspelzenxylan (unbehandelt, autoklaviert, ultraschall)			
Natriumacetatpuffer pH 6,0	0,10	0,80	54
Azurin B mit Haferspelzenxylan (monocarboxymethyliert)			
Natriumacetatpuffer pH 6,0	0,10	0,70	56
Futtermittel A-Extrakt pH 6,0	0,10	0,12	57
Rutheniumrot mit Haferspelzenxylan (monocarboxymethyliert)			
Natriumacetatpuffer pH 6,0	0,05	0,20	59
Rutheniumrot mit Haferspelzenxylan (ultraschallbehandelt und monocarboxymethyliert)			
Natriumacetatpuffer pH 6,0	0,05	0,50	59

* es wird stets der lineare Meßbereich (Extinktion–Enzymkonzentration) angegeben

5.3 Farbreaktion — Methodenentwicklung und Anwendung

Die Bestimmung der Extinktion von der Reaktion des Reaktivfarbstoffs RBB mit hydrolysiertem Futtermittel bzw. hydrolysiertem Haferspelzenxylan zeigte einen linearen Zusammenhang zur Enzymkonzentration. Je höher die Enzymkonzentration, desto weniger RBB reagiert mit dem Haferspelzenxylan (s. Einfluß des Futtermittels auf die Enzymaktivitätsbestimmung), d.h. RBB reagiert besser mit unhydrolysiertem Xylan als mit hydrolysiertem. Diese Reaktion sollte zur Enzymaktivitätsbestimmung ausgenutzt werden. Dazu wurden Vorversuche mit verschiedenen Reaktivfarbstoffen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß z.B. Reaktivgrün mit hydrolysiertem Haferspelzenxylan besser reagiert, als mit unhydrolysiertem, d.h. die negative Extinktion im Verhältnis zum Blindwert ist größer.

Es wurden verschiedene Reaktionsbedingungen ausprobiert. Dazu wurde enzymatisch hydrolysierte Ultraschallxylanlösung mit Farbstofflösung (Reaktivgrün, Azurin A etc.) versetzt, inkubiert, sofort erhitzt oder mit NaOH alkalisiert und anschließend erhitzt. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abkühlt, das hochmolekulare Xylan mittels Ethanol ausgefällt, zur Gleichgewichtseinstellung stehen gelassen, zentrifugiert, in Küvetten umgefüllt und sofort gemessen. Die Versuche wurden ohne die Gleichgewichtseinstellung zwischen dem am Substrat gebunden und im Ethanol-Wassergemisch gelösten Farbstoff abzuwarten und mit mehreren Reaktivgrünkonzentrationen wiederholt. Von den getesteten Reaktionsbedingungen erwies sich die Variante mit der Inkubation, Alkalisierung und anschließendem Aufkochen als brauchbar. Um den für die Enzymbestimmung mittels Reaktion mit den hydrolysierten Endprodukten am besten geeigneten Farbstoff zu finden, wurde eine 0,5%ige Ultraschallxylanlösung mit 100 IE/ml Lyxasan® 48 h bei 40°C in Natriumacetatpuffer hydrolysiert, mit verschiedenen Farbstoffen umgesetzt und die Extinktionen gegenüber unhydrolysiertem Ultraschallxylan (UX), welches mit den entsprechenden Farbstoffen umgesetzt wurde, gemessen. Die höchsten Extinktionsdifferenzen wurden mit den in Tab. 39 aufgeführten Farbstoffen erzielt.

Tabelle 39: Extinktionen verschiedener Farbstoffe nach der Reaktion mit hydrolysiertem und unhydrolysiertem Ultraschallxylan

Farbstoff	Wellenlänge [nm]	unhydrolysiert	hydrolysiert	Differenz
Reaktivgrün 19	650	-1,00	-2,99	-1,99
Calcufluor	380	-0,57	0,42	0,99
Azurin B	600	-0,54	-1,45	0,91
Azurin A	600	-1,00	-1,80	0,80
Reaktivorange	450	-0,95	-0,14	0,60

Tabelle 40: Extinktion verschiedener Reaktivgrünkonzentrationen nach dem Umsatz mit 48 h bei RT inkubierten ultraschallbehandelten Haferspelzenxylan

Farbstoffkonzentration [%]	Absorption [650 nm]
0.5	-0,055
1	-0,242
2	-0,229
3	-0,205

Wie aus Tabelle 39 ersichtlich ist Reaktivgrün am besten geeignet, da es die größte Absorptionsdifferenz zwischen hydrolysierten und unhydrolysierten Ultraschallxylan zeigt. Als optimale Farbstoffkonzentration erwies sich eine 0,5 bis 1% Reaktivgrün-Lösung, da bei hoher Farbstoffkonzentration (>1%) die Absorptionsdifferenz zwischen hydrolysiertem und unhydrolysiertem

Haferspelzenxylylan (Tab. 40) kleiner wurde. Eine weitere Beobachtung war, daß Hydrolyseprodukte, die durch Enzympräparate entstehen, die mehrere verschiedene Xylanasen enthalten, besser mit Reaktivgrün reagieren als Hydrolyseprodukte, die durch Enzympräparate erzeugt werden, die nur eine Xylanase enthalten. Deshalb ließen sich anfangs bei den hier beschriebenen Versuchen nur von Lyxasan® (Abb. 63) niedrige Enzymaktivitäten im Futtermittel A-Extrakt mit der Farbreaktionsmethode bestimmen.

Tabelle 41: Absorption [650 nm] nach Langzeitinkubation mit 5 IE/ml bei RT und Umsatz mit Reaktivgrün

Inkubationszeit		100 h	160 h
Enzym	Anzahl Xylanasen	Absorption	
Biofeed plus®	≥2	-0,567	-0,70
Biofeed Wheat®	1	-0,442	-0,70
Biopract®	≥2	-0,575	-0,75
Roxazyme®	≥2	-0,382	-0,74
Avizyme®	≥2	-0,469	-0,72
Energex®	≥2	-0,598	-0,75
Hostazym X®	≥2	-0,468	-0,73

Ein Langzeitversuch (Tab. 41 und 42) zeigte allerdings, daß Enzympräparate mit anderer Xylanaseanzahl Haferspelzenxylylan ebenfalls zu Produkten hydrolysierte, die mit Reaktivgrün reagierten. Mit einer geringeren Farbstoffkonzentration (0,1%) wurde die Aktivität von Enzympräparat Hostazym X® im Futtermittel G bestimmt (Abb. 62), allerdings war wegen der niedrigen Farbstoffkonzentration die Extinktionsdifferenz zwischen hohen und niedrigen Enzymkonzentrationen nur gering.

Tabelle 42: Abhängigkeit der Farbreaktion von der Inkubationsdauer

Inkubationszeit [h]	Absorption [650 nm]
48	-0.242
100	-0.567
160	-2.400
> 160	-2.400

1% Reaktivgrün Absorption [650 nm],
Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger* I)

In Tabelle 43 sind die Extinktionen aufgeführt, die aus Messung des Blindwertes gegen Reaktivgrün, welches 48–160 h mit Lyxasan® inkubierten und anschließend mit Reaktivgrün umgesetzten ultraschallbehandeltem Haferspelzenxyylan. Je länger die enzymatischen Hydrolyse andauert, desto mehr Reaktivgrün wird von den Hydrolyseprodukten gebunden. Die Extinktion ändert sich nach einer längeren Inkubationszeiten als 160 h ändert sich nicht mehr.

Tabelle 43: 120–160 h Inkubation, 5 IE/ml, Ultraschallxyylan und Umsatz mit Reaktivfarbstoff

Enzympräparat	Reaktivorange [450 nm]			Reaktivgrün [650 nm]		
	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Farbstoffkonzentration in %						
Biofeed plus®	0,05	-0,40	0,10	-0,70	-2,9	-2,4
Biofeed Wheat®	0,03	-0,35	-0,03	-0,70	-2,9	-2,4
Biopract®	0,05	-0,35	-0,04	-0,75	-2,9	-2,9
Roxazyme®	0,02	-0,36	-0,06	-0,74	-2,9	-2,9
Avizyme®	0,04	-0,35	-0,02	-0,72	-2,9	-2,9
Energex®	0,06	-0,35	-0,05	-0,75	-2,9	-2,9
Hostazym X®	0,05	-0,40	-0,07	-0,73	-2,9	-2,9

Hydrolyseversuche (120–160 h) mit Azurin A, B und Reaktivorange in verschiedenen Konzentrationen (0,1, 0,5, 1%) mit unterschiedlichen Enzympräparaten zeigten zwar negative Extinktionsdifferenzen, aber keinen Zusammenhang zur Enzymkonzentration (Tab. 43 u. 44). Nur durch die Reaktion von Reaktivgrün (0,1, 0,5, 1% wurden getestet) mit durch verschiedene Enzyme hydrolysiertem ultraschallbehandeltem Haferspelzenxyylan wurden reproduzierbare hohe negative Extinktionen erhalten (-0,7 bei 0,1%, -2,9 bei 0,5%–1%).

Tabelle 44: 120–160 h Inkubation, 5 IE/ml, Ultraschallxyylan und Umsatz mit Reaktivfarbstoff

Enzympräparat	Azurin A [600 nm]			Azurin B [600 nm]		
	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Farbstoffkonzentration in %						
Biofeed plus®	-1,6	0,01	0,07	-0,548	-0,11	0,23
Biofeed Wheat®	-1,7	-0,07	-0,023	-0,510	-0,12	1,00
Biopract®	-1,6	0,01	0,172	-0,478	-0,08	0,50
Roxazyme®	-1,6	-0,10	-0,12	-0,500	-0,12	0,40
Avizyme®	-1,6	-0,03	-0,128	-0,490	-0,10	1,00
Energex®	-1,6	-0,01	0,18	-0,510	-0,01	1,20
Hostazym X®	-1,6	-0,06	0,12	-0,500	-0,19	0,80

Die „Farbreaktionsmethode“ zur Enzymbestimmung wurde also wie folgt durchgeführt: Ultraschallxyylanlösung wird mit der Enzymprobe 30–60 min bei 40°C inkubiert, mit 0,5%iger wässriger Reaktivgrünlösung versetzt, 30 min bei 40° inkubiert, mit 4 N NaOH alkalisiert und anschließend 5 min erhitzt. Die Proben werden auf Raumtemperatur abgekühlt, das hochmolekulare Xylan mittels des doppelten Ethanolvolumens ausgefällt, bei 9000 ×g abzentrifugiert, der Überstand in Küvetten umgefüllt und sofort gegen die gleichbehandelte Blindprobe ohne Enzym gemessen.

Diese Methode wurde zur Aktivitätsbestimmung von Enzympräparaten in Natriumacetatpuffer (Abb. 61) und Enzymen im Futtermittel A- und G-Extrakt (Abb. 62 und 63) eingesetzt.

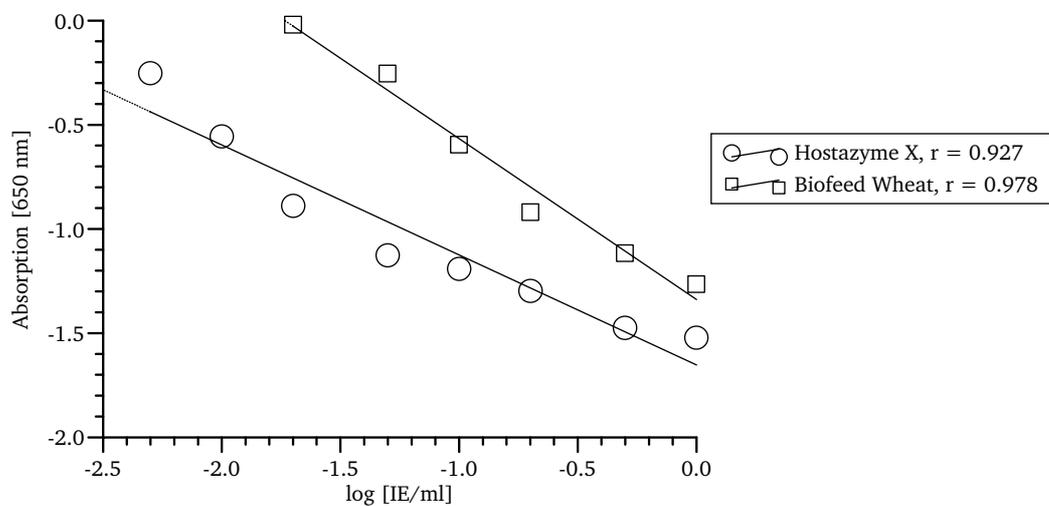


Abbildung 61: Farbreaktion mit Reaktivgrün, Enzympräparate Biofeed Wheat® und Hostazym X® in Natriumacetatpuffer pH 6,0 bzw. pH 4,5

Die negativen Extinktionen, die durch enzymatische Hydrolyse von Ultraschallxyylan durch die Enzyme Biofeed Wheat® und Hostazym X® in Natriumacetatpuffer, bzw. von Hostazym X® in Futtermittel G-Extrakt gemessen wurden (Abb. 61), zeigen im Gegensatz zu den Extinktionen von Lyxasan (Abb. 63) in Futtermittel G-Extrakt über den geprüften Konzentrationsbereich einen logarithmischen Zusammenhang von Enzymkonzentration und Extinktion.

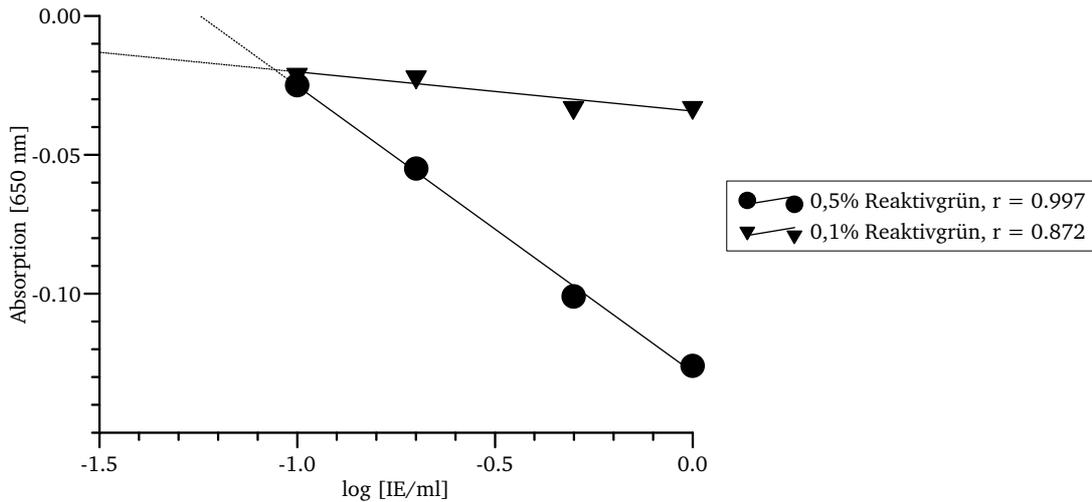


Abbildung 62: Farbreaktion, Hostazym X[®] in Futtermittel G, verschiedene Reaktivgrün Konzentrationen

Die Steigung der Geraden, die durch Reaktion mit 0,1%iger Reaktivgrünlösung aufgenommen wurde ist wesentlich flacher und die absoluten Extinktionen sind wesentlich kleiner als die, die mit 0,5% Reaktivgrünlösung aufgenommen wurden. Die Extinktionen, die mit 1%iger Reaktivgrünlösung aufgenommen wurden zeigten keinen auswertbaren Unterschied zwischen den verschiedenen Enzymkonzentrationen.

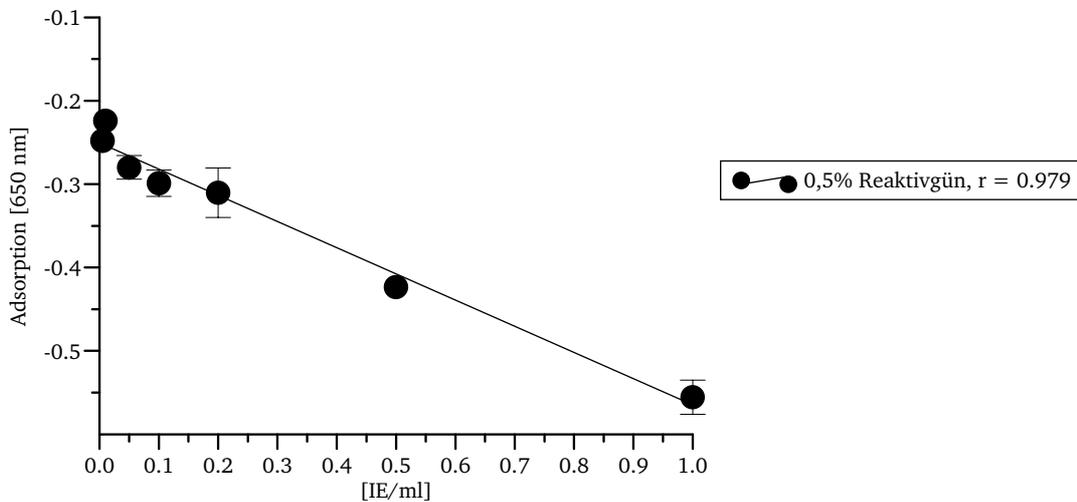


Abbildung 63: Farbreaktion, Enzympräparat Lyxasan[®] (*A. niger I*) in Futtermittel G pH 6,0

Mit Enzympräparat Lyxasan[®] in Futtermittel G wurde über den geprüften Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zur Enzymkonzentration gefunden (Abb. 63).

Tabelle 45: Meßbereiche und Detektionsgrenzen der Enzymaktivitätsbestimmung (gegenüber Xylan), Farbreaktion in verschiedenen Matrices

Versuchsmatrix	Detektionsgrenze [IE/ml]	Meßbereich* (Extinktion)	Abbildung Nr.
Natriumacetatpuffer pH 6,0	0,005	1,6	61
Futtermittel-G Extrakt pH 6,0	0,050	0,4	63

In Tabelle 45 sind die Detektionsgrenzen und Meßbereiche der „Farbreaktion“ aufgeführt. Sie liegt bei 0,005 in Natriumacetatpuffer und bei 0,05 in Futtermittelextrakt.

Der Versuch, mittels der Farbreaktionsmethode eine unbekannte Enzymkonzentration von Lyxasan in Futtermittelproben mit der „Spiking“-Methode durch Zugabe von verschiedenen hohen Enzymkonzentrationen im Bereich der unbekanntenen Konzentration und anschließender Extrapolation zu einem Null-Wert zu bestimmen, lieferte bei der Auswertung der Extinktionen eine zu hohe Enzymkonzentration als Ergebnis.

5.4 Substratmodifikation

5.4.1 Physikalische Substratmodifikation

Von dem durch Oberflächenvergrößerung mit Ethanol suspendierten und anschließend gelösten Haferspelzenxylan fielen bereits nach 24 h ca. 50% aus bzw. ließen sich bei 12000 × g abzentrifugieren. Aufgekochtes bzw. autoklaviertes Haferspelzenxylan blieb ebenfalls zu ca. 50% in Lösung.

Durch die Ultraschallbehandlung ließen sich 99% des Xylans in Lösung bringen. Die Lösungen wurden mit 4 mg NaN₃ (= 0.08 mg/ml) als Bakterizid versetzt. Sie ließen sich bei Raumtemperatur aufbewahren, innerhalb von 4 Wochen Lagerung war kein Niederschlag zu beobachten.

Es wurde versucht, ultraschallbehandeltes, enzymatisch hydrolysiertes und autoklaviertes Haferspelzenxylan mittels Gelfiltration nach Molekülgröße aufzutrennen. Die mit der Gelfiltration erhaltenen Fraktionen von kleiner Molekülgröße hatten für Enzymtests eine zu geringe Konzentration, aufkonzentrieren war nicht praktikabel. Der Zeitaufwand war zu groß, die für Enzymtests benötigte Xylanmenge zu gewinnen. Es wurde versucht, das ultraschallbehandelte, enzymatisch behandelte und den Überstand (Phase 1) des autoklavierten Xylans mittels Proteinfilter stufenweise zu filtrieren. Es gab jedoch nur 2 Fraktionen, eine die entweder nicht durch den 300 kD Filter filtrierbar waren oder den 5 kD Filter passierten. Die Ausbeute an Haferspelzenxylan, daß sich durch einen 5 kD Filter filtrieren ließ, war jedoch sehr gering.

5.4.2 Chemische Modifikation

5.4.2.1 Saure bzw. basische Behandlung

Die alkalischen Lösungen lösten zwar das Xylan, sobald jedoch die Lösungen auf einen für enzymatische Reaktionen geeigneten pH-Wert (z.B. 6,0) eingestellt wurden, fielen etwa 50% des gelösten Haferspelzenxylans (Bestimmt über TS) wieder aus, bzw. ließen sich bei 12000 ×g abzentrifugieren. Konzentrierte Essig-, Salz-, oder Phosphorsäure bewirkten keine in Enzymtests detektierbaren Veränderungen am Substrat. Mit Schwefelsäure hydrolysiertes Haferspelzenxylan war für enzymatische Reaktionen nicht geeignet.

5.4.2.2 Acetylierung

Die Ausbeute an acetyliertem Haferspelzenxylan bei der Verwendung von Essigsäureanhydrid war bei den Reaktionstemperaturen 0° und 10° C sehr gering, bei 60° bzw. 100° C wurde eine etwas höhere Ausbeute erhalten, die stark verunreinigt war. Die schwarzen Verunreinigungen ließen sich durch wiederholtes Lösen in Aceton, Abzentrifugieren und erneutes Ausfällen nicht entfernen.

Bei Verwendung von Acetylchlorid als Acetylierungsmittel war die Ausbeute bei 60° C sehr gering und stark verunreinigt. Bei 0° C bzw. 10° C wurde eine höhere Ausbeute erhalten. Das Produkt löste sich teilweise in Aceton bzw. Tetrahydrofuran (THF). Das Produkt der Benzoxylie- rung war ebenfalls teilweise in THF bzw. Aceton löslich.

5.4.3 Enzymatische Modifikation

Wurde das Haferspelzenxylan vor der enzymatischen Hydrolyse autoklaviert, so befand sich nach anschließender Filtration über den 5 kD Filter eine doppelt so hohe Xylankonzentration im Filtrat (TS) als bei der enzymatischen Hydrolyse ohne vorherige Autoklavierung. Enzymatisch behandeltes Haferspelzenxylan ließ sich nicht mit ionischen Farbstoffen koppeln, da der Polymerisationsgrad und damit die Zahl der chelatisierenden OH-Gruppen des Moleküls zu klein war, um den ionischen Farbstoff einzuschließen. Der gesamte Farbstoff wurde ausgewaschen. Auch mit den verschiedenen Reaktivfarbstoffen ließ sich kein zur Enzymaktivitätsbestimmung brauchbares chromogenes Substrat herstellen, da die Substrate mit gekoppeltem Farbstoff nicht meßbar von anderen Enzymen hydrolysiert wurden. Die einzige Verwendung des enzymatisch hydrolysierten Haferspelzenxylans war im Agardiffusionstest möglich. Das Substrat brachte aber keine Verbesserung.

5.5 Substratcharakterisierung

Mit dem Dinitrosalicylsäurereagenz wurde geprüft (DNSS-Test) ob es zwischen dem ultraschallbehandelten, autoklavierten und dem carboxymethylierten (mono-, di-, max.-) Hafer-

spelzenxylan Unterschiede in der Anzahl der reduzierenden Gruppen gab. Als Blindprobe diente unbehandeltes Haferspelzenxylan. Es wurden sowohl bei dem autoklavierten, als auch bei dem ultraschallbehandelten Haferspelzenxylan keine Unterschiede gegenüber dem unbehandeltem gefunden. Das monocarboxymethylierte dagegen hatte ca. 40% der Reaktivität des unbehandelten Haferspelzenxylans, das dicarboxymethylierte 10% und das maximal carboxymethylierte Haferspelzenxylan reagierte praktisch nicht mit dem DNSS-Reagenz.

Eine Unterscheidung der verschiedenen Behandlungsvarianten (autoklaviert, ultraschallbehandelt, unbehandelt, carboxymethyliert) war mittels Ionenchromatographie in einer HPLC (Fa. Dionex, Idstein) mit amperometrischer Detektion nicht möglich, da das Xylan zu hochmolekular war. Die Carboxymethylgruppe konnte mittels NMR nachgewiesen werden.

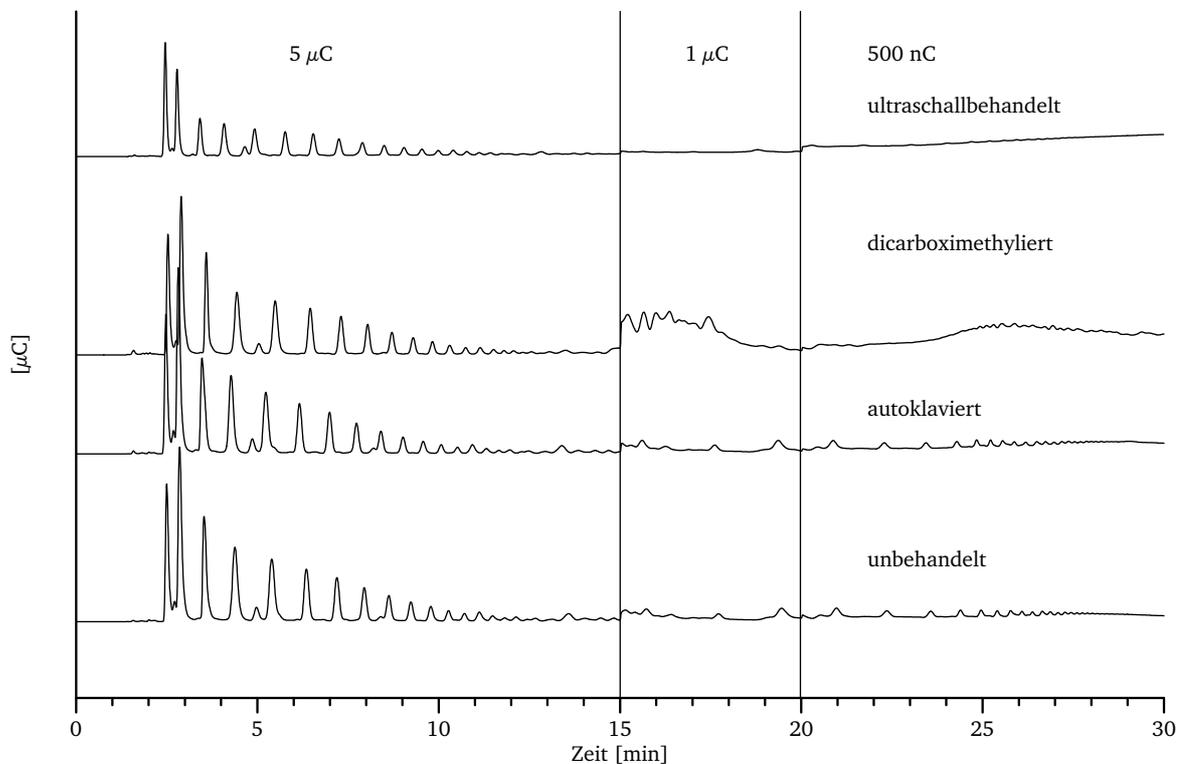


Abbildung 64: Hydrolysemuster sauer hydrolysierter Haferspelzenxylanderivate

Es konnten zwischen den verschiedenen Substratmodifikationen Unterschiede festgestellt werden, wenn das Xylan enzymatisch hydrolysiert und die Hydrolyseprodukte anschließend in der HPLC aufgetrennt wurden. Es fehlten bei saurer Hydrolyse verschiedene kleinere Abbauprodukte (Abb. 64), und die carboxymethylierten Bruchstücke wurden aufgrund negativer Ladung später eluiert (ca. 15 min). Die Hydrolysemuster des autoklavierten und unbehandelten Haferspelzenxylan sind praktisch identisch. Im Hydrolysemuster des ultraschallbehandelten Haferspelzenxylan fehlten die größeren Xylooligomere ab DP 16, die im Hydrolysemuster vom unbehandelten Haferspelzenxylan noch zu erkennen sind.

Unbehandeltes Haferspelzenxylan, autoklaviertes Xylan (Gesamtfraktion) und Ultraschallxylan wurde durch Aufkochen gelöst, mit Ethanol bzw. Isopropanol gefällt, getrocknet und in einer Gefriermühle in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Es wurde mittels NMR das Verhältnis von chemisch gebundenem Wasser zu freiem Wasser bezogen auf unbehandeltes Haferspelzenxylan bestimmt.

Die mit Ethanol ausgefällten physikalisch modifizierten Xylane zeigten bei der Bestimmung des Verhältnisses von chemisch gebundenem zu freiem Wasser keinen Unterschied. Zwischen den mit Isopropanol gefällten physikalisch modifizierten Haferspelzenxylanen sind Unterschiede erkennbar (Tab. 46). Beim unbehandeltem Haferspelzenxylan ist der Anteil des chemisch gebundenen Wassers größer und der des freien Wassers kleiner als bei Ultraschall- bzw. autoklaviertem Xylan. Ultraschallxylan hatte den größten Anteil an freiem Wasser.

Freies Wasser:	unbehandelt	<	autoklaviert	<	UX
Chemisch gebundenes Wasser:	unbehandelt	>	autoklaviert	>	UX

Tabelle 46: Eingelagertes Wasser in durch Isopropanol gefällten Xylanderivaten

Behandlung	Intensität des freien Wasser im Verhältnis zum chemisch gebundenem Wasser [%]
unbehandelt	100,00
autoklaviert	114,67
ultraschall	118,82

Mit autoklaviertem bzw. unbehandeltem Haferspelzenxylan ließen sich Lösungen von bis zu 4% durch Aufkochen herstellen. Das Haferspelzenxylan blieb aber nach dem Abkühlen nicht in Lösung. Mit ultraschallbehandeltem Xylan lassen sich Lösungen bis zu ca. 5% herstellen und bei Raumtemperatur lagern. Carboxymethyliertes Xylan war bis zu 10% löslich.

Um die Molmasse des Ultraschallxylans und des unbehandelten Haferspelzenxylans mittels GPC oder Membranosmose zu bestimmen, muß es acetyliert werden, damit es in Tetrahydrofuran (THF) löslich wird. Eine Molmassenbestimmung war nicht möglich, da sowohl das acetylierte, als auch das benzoxylierte Haferspelzenxylan so groß war, daß sich nur kleinere Bruchstücke in geeigneter Konzentration lösten, und deshalb die tatsächliche Molmasse nicht bestimmt werden konnte.

Titrationen von ultraschallbehandeltem, autoklaviertem, unbehandeltem und carboxymethyliertem Haferspelzenxylan zeigten keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Behandlungen. Unbehandeltes- und autoklaviertes Haferspelzenxylan gab mit Kongorot einen Nieder-

schlag, ultraschallbehandeltes konnte nicht ausgefällt werden. Die Viskosität der Lösung und die Konzentration des gelösten Haferspelzenxylans steigt mit der Dauer der Ultraschallbehandlung (Abb. 65).

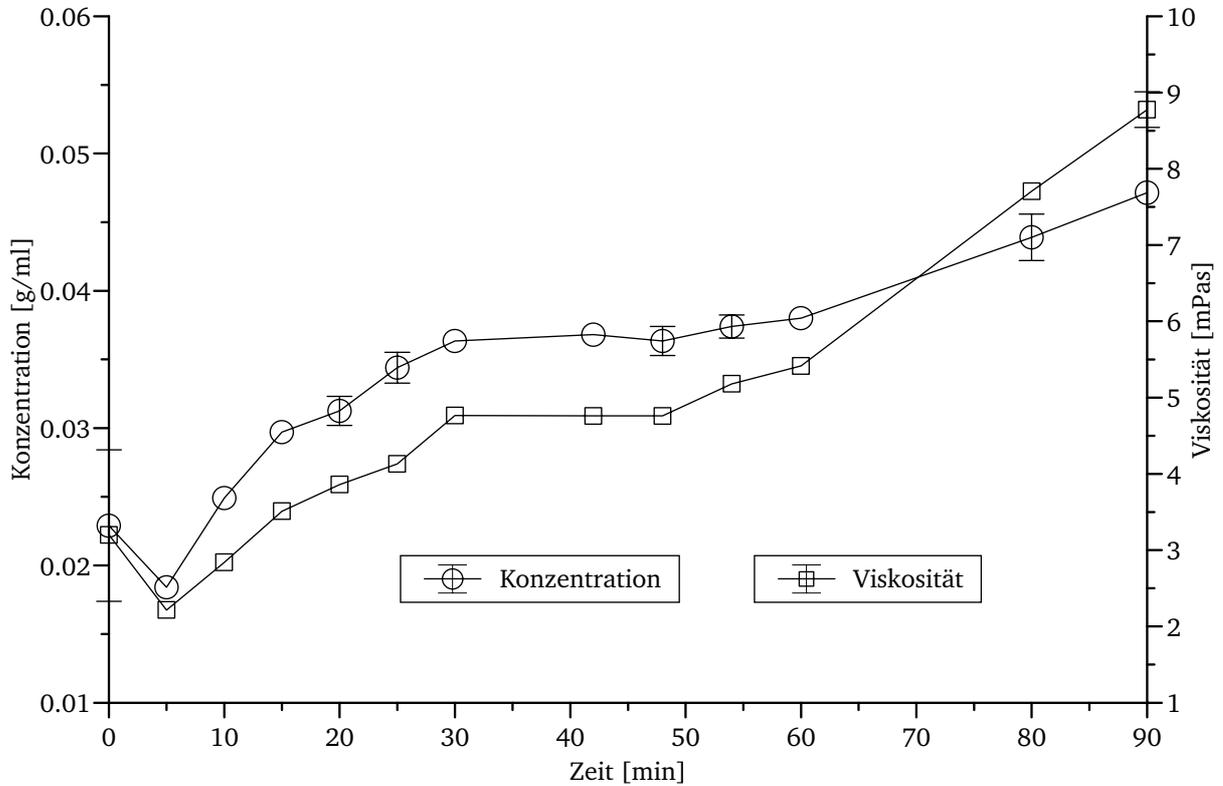


Abbildung 65: Viskositäts- und Konzentrationsänderung von in Natriumacetatpuffer suspendiertem Haferspelzenxylan (5%) in Abhängigkeit von der Dauer der Ultraschallbehandlung, 70 W, 20 kHz, 70 Zyklen

In Tabelle 47 sind die Absorptionsmaximae der chromogene Substrate in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 und in den Futtermittel-Extrakten aus Futtermittel A und G in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 zusammengestellt. Im Futtermittel-extrakt (A u. G) war generell eine Verschiebung des Maximums in den höheren Absorptionsbereich zu erkennen. Das Absorptionsmaximum von Reaktivschwarz wurde in den niedrigeren Absorptionsbereich verschoben. Außerdem war die Extinktion der Maximae von allen chromogenen Substraten im Futtermittel-extrakt deutlich niedriger als im Puffer.

Tabelle 47: Absorptionsmaximae der chromogenen Substrate

chromogene Komponente	hydrolysierbare Komponente	Absorptionsmaximae [nm]	
		Natriumacetat- puffer pH 6,0	Futtermittlextrakt (A u. G) pH 6,0
Ionische Farbstoffe			
Brilliant Yellow	alle*	350–480	380–400
Calcfluor	alle*	320–380	320–380
Kongorot	alle*	498–510	498–510
Trypan Blue	alle*	315 + 600	315 + 600
Kovalentgebundene Farbstoffe			
Azurin A	alle*	590–650 + 310–315	590–650
Azurin B	alle*	590–610 + 300–315	590–610
Basilin Blue E–3G	alle*	590–740 + 300–315	590–700
Cibacron Blue 3 GA	alle*	590–740 + 300–315	590–700
Reaktivgelb	alle*	380–450	380–450
Reaktivgrün	alle ¹	550–720	550–750
Reaktivgrün	ultraschallbehandelt	400–460 + 530–720	400–460 + 530–720
Reaktivorange	alle*	320–460	320–500
Reaktivrot	alle*	480–560	450–580
Reaktivschwarz	alle*	500–620	550–600 (sehr schwach)
Remazol Brilliant Blue	alle*	550–650	550–650
Remazol Brilliant Violet 5R	alle*	500–580	490–610
Kationischer Farbstoff			
Rutheniumrot	alle*	500–550	500–550
Futtermittlextrakt			
<i>Futtermittel-Extrakt (A u. G)</i>	–	280–380	–

*alle = carboxymethyliert (mono-, di-), unbehandelt, autoklaviert, ultraschallbehandelt

¹ohne ultraschallbehandeltes Haferspelzenxylan

5.6 Einfluß des Futtermittels auf die Enzymaktivitätsbestimmung

Das Absorptionsspektrum von Futtermittel A- und G-Extrakt in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 wurde gegen 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 im Photometer aufgenommen. Das Absorptionsmaximum lag bei 280–380 nm (Tab. 47).

Futtermittel A wurde als Substrat im Agardiffusionstest mit Lyxasan® auf die gleiche Weise eingesetzt, wie z.B. Haferspелzenxylan. Es konnte eine Kalibrationsgerade (Abb. 66), ähnlich wie mit Haferspелzenxylan, erzeugt werden. Der Farbkontrast zwischen den Lysezonen und dem Substratagar war allerdings schwächer als in Agardiffusionstests mit Haferspелzenxylan als Substrat. D.h. das Xylanase betonte Enzympräparat Lyxasan® hydrolysiert die Pentosane (Xylane) aus dem Weizen in der Futtermittelmischung A.

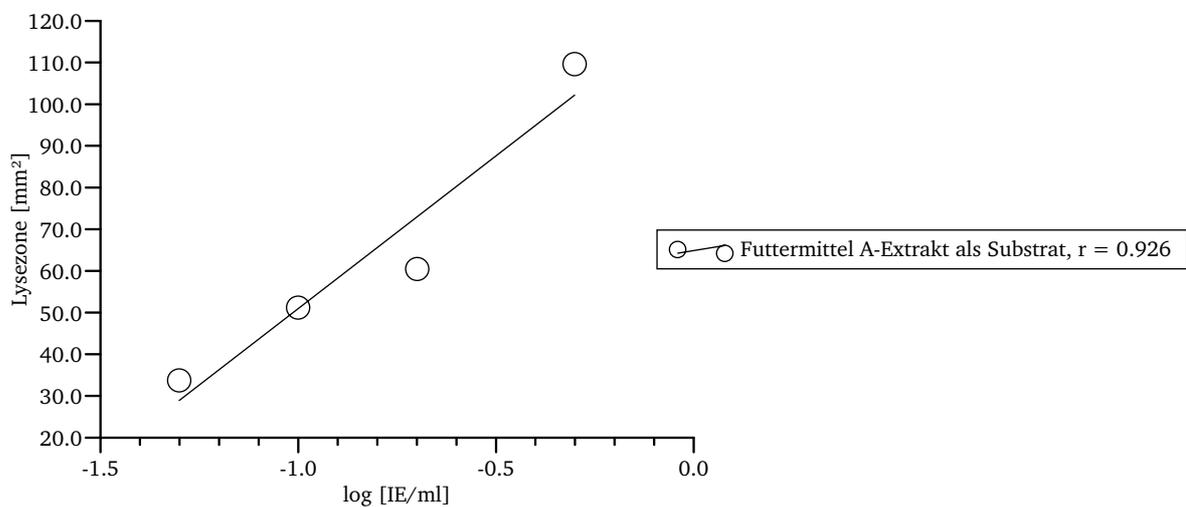


Abbildung 66: Agardiffusionstest mit Futtermittel A-Extrakt als Substrat, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger I*) in pH 6,0 Natriumacetatpuffer

Um zu klären, ob freier Reaktivfarbstoff bzw. kleine Hydrolyseprodukte mit gekoppeltem Reaktivfarbstoff mit dem Protein des Enzyms reagiert, wurde zu Enzympräparaten Rinderserumalbumin (RSA) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und die Aktivität mit verschiedenen chromogenen Substraten bestimmt. Das Protein (RSA) störte die Enzymaktivitätsbestimmung mit chromogenen Substraten in Puffer nicht. Der Reaktivfarbstoff reagierte wahrscheinlich nicht mit dem Protein des Enzympräparates, sondern mit Komponenten aus dem Futtermittel. Deshalb wurde als nächstes freier Reaktivfarbstoff (RBB) in verschiedenen Konzentrationen zu den chromogenen Substraten aus unbehandeltem und autoklavierten Haferspелzenxylan mit gekoppeltem RBB gegeben. So sollten die reaktiven Komponenten des Futtermittels mit freiem Farbstoff abgesättigt werden. Dadurch sollte praktisch ein Offset (eine konstante Hintergrundabsorption) erzeugt werden über dem die Extinktion der hydrolytisch aus dem chromogenen Substrat freigesetzten Komponenten mit gekoppeltem Farbstoff gemessen werden kann. Die Enzym-

aktivitätsbestimmung im Futtermittel A-Extrakt mit RBB-Haferspelzenxylylan (unbehandelt und autoklaviert) und 0,1% freiem RBB führte zu einem linearen negativen Kurvenverlauf der Extinktionen (Abb. 67). Bei hoher Enzymkonzentration wurde viel chromogenes Substrat und der für das Enzym verwertbare Teil des Futtermittelsextraktes hydrolysiert. Dadurch wurden die reaktiven Gruppen des Futtermittels abgebaut, und es reagierte weniger RBB mit dem Futtermittel als in der Blindprobe. Die Absorption nimmt mit steigender Enzymkonzentration zu. Je weniger Enzymaktivität in der Probe vorhanden war, desto mehr RBB reagierte mit dem unhydrolysierten Futtermittel.

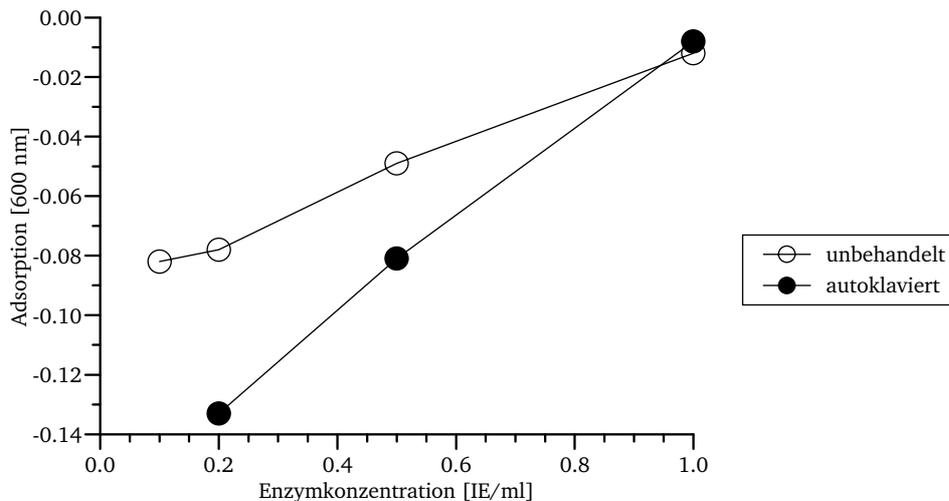


Abbildung 67: Chromogenes Substrat aus Haferspelzenxylylan (unbehandelt und autoklaviert) mit Remazol Brilliant Blue (RBB), Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger* I) in Futtermittel A-Extrakt pH 6,0, 0,1% überschüssiges RBB zur Maskierung der reaktiven Komponenten aus dem Futtermittel, T=40°C

Der Effekt, daß RBB mit unhydrolysiertem Futtermittel reagierte, konnte durch einen Versuch bestätigt werden, in dem Futtermittel A-Extrakt als enzymatisch hydrolysierbares Substrat und Reaktivfarbstoff RBB mit Enzympräparat Lyxasan® inkubiert wurden. Die photometrische Auswertung der Reaktion des RBB mit dem hydrolysierten Futtermittel führte ebenfalls zu einem Kurvenverlauf mit einem linearen Zusammenhang zwischen den negativen Extinktionen und der Enzymkonzentration (Abb. 67).

Bei hoher Enzymkonzentration wurde viel von dem enzymatisch hydrolysierbaren Teil des Futtermittelsextraktes hydrolysiert. Dadurch wurden die reaktiven Gruppen des Futtermittels abgebaut, und es konnte nicht soviel RBB wie in der Blindprobe mit dem Futtermittel reagieren. Die Extinktion nahm mit steigender Enzymkonzentration zu. Je weniger Enzym in der Probe war, desto mehr RBB reagierte mit dem unhydrolysierten Futtermittel (Abb. 68).

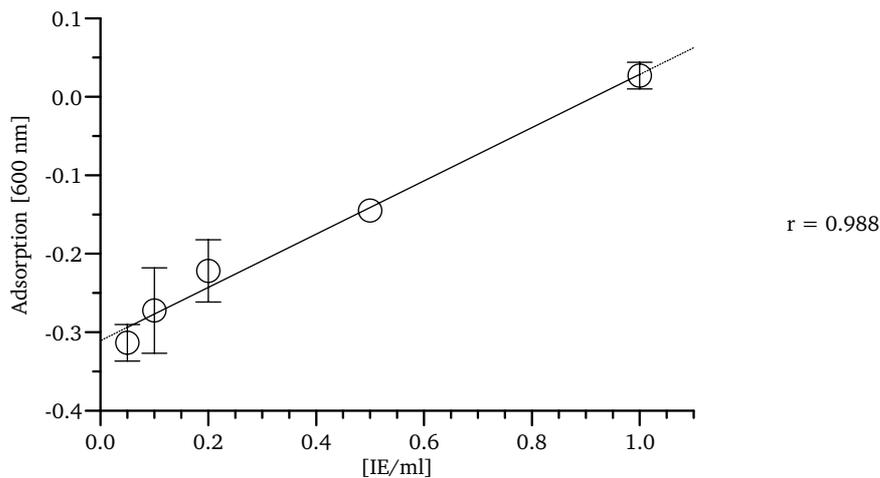


Abbildung 68: Futtermittel A-Extrakt als Substrat, Enzympräparat Lyxasan® (*A. niger* I) und 0,1%iges Remazol Brilliant Blue, T = 40°C

5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 48: Detektionsgrenzen und Meßbereiche der in verschiedenen Medien angewendeten Enzymaktivitätsbestimmungsmethoden auf β -Glucan

Verfahren	Detektionsgrenze	Meßbereich	
Natriumacetatpuffer pH 6,0			
Agardiffusion mit ultraschallbehandeltem β -Glucan	0,01	20–50	[mm ²] Lysezone
Viskositätsdifferenz mit β -Glucan	0,10	1,5	[mPas]
Glucazymetabletten	0,05	2	Extinktion
Futtermittlextrakt pH 6,0			
Agardiffusion mit ultraschallbehandeltem β -Glucan	0,02	20–50	[mm ²] Lysezone
Viskositätsdifferenz mit Lichenin (β -Glucan)	0,05	2,3–4	[mPas]
Digesta pH ca. 6			
Viskositätsdifferenz mit Lichenin (β -Glucan)	0,10	2–4	[mPas]

In den Tabellen 48 und 49 sind die Detektionsgrenzen und Meßbereiche der in dieser Arbeit erfolgreich angewendeten Enzymbestimmungsmethoden auf β -Glucanase- und Xylanaseaktivität zusammengestellt. Die Bestimmungen erfolgten mit kommerziellen Präparaten und modifizierten Substraten. Sie wurden im unteren Grenzbereich der einzelnen Methoden durchgeführt.

Tabelle 49: Detektionsgrenzen und Meßbereiche der in verschiedenen Medien angewendeten Enzymaktivitätsbestimmungsmethoden gegenüber Xylan

Verfahren	Detektionsgrenze	Meßbereich	
Natriumacetatpuffer pH 6,0			
Agardiffusion mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan	0,005	10–60	[mm ²] Lysezone
Viskositätsdifferenz mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan	0,010	5	[mPas]
Xylazymetabletten	0,050	2	Extinktion
Farbreaktion	0,005	1,6	Extinktion
Futtermittlextrakt pH 6,0			
Agardiffusion mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan	0,005	20–85	[mm ²] Lysezone
Viskositätsdifferenz mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan	0,010	5	[mPas]
Xylazymetabletten	0,050	2	Extinktion
Farbreaktion	0,050	0,4	Extinktion
Digesta pH ca. 6			
Viskositätsdifferenz mit ultraschallbehandeltem Haferspelzenxylan	0,025	4	[mPas]
Xylazymetabletten	0,050	2	Extinktion

Tabelle 50 zeigt eine Aufstellung einiger zu Fütterungsversuchen verwendeter Enzympräparate. Es wurde bei der Zusammenstellung die in dieser Arbeit mittels DNSS-Test bestimmte Empfindlichkeit des Präparates zu Grunde gelegt. Als weitere Voraussetzungen wurde von einer 100%igen Extraktion und einem Aktivitätsverlust nach dem Pelletieren von 50% ausgegangen. Die Bestimmungsgrenzen der verschiedenen Methoden wurden den Tabellen 48 und 49 entnommen. Danach ist die Aktivität auf Xylan von allen Präparaten mit den 4 geprüften Methoden theoretisch bestimmbar. Die Aktivität auf β -Glucan ist von allen Präparaten bis auf Avizyme® im Futtermittel mittels Agardiffusion und Viskosität theoretisch bestimmbar.

Tabelle 50: Enzymzugabe in Fütterungsversuchen

	Aktivität [IE/g] ¹	50% Restaktivität [IE/ml] ²	Detektierbar mit Enzymbestimmungsmethode			
			Agardiffusion	Viskosität	Chromogene Substrate	Farbreaktion
1,1 g/kg Avizyme® [FUENTE ET AL. 1998]						
Xylan	2262	0,200	ja	ja	ja	ja
β-Glucan	52	0,005	nein	nein	n.b.	n.b.
0,3–1 g/kg Biofeed plus® [LOHMANN 1994]						
Xylan	1706	0,170	ja	ja	ja	ja
β-Glucan	689	0,070	ja	ja	n.b.	n.b.
0,4 g/kg Biofeed Wheat® [FÜTTERUNGSVERSUCHE. INSTITUT FÜR TIERERNÄHRUNG 1998]						
Xylan	1173	3,760	ja	ja	ja	ja
β-Glucan	36	1,280	ja	ja	n.b.	n.b.
0,2 g/kg Biopract® [GLÄSER 1997]						
Xylan	3760	0,004	ja	ja	ja	ja
β-Glucan	12820	0,120	ja	ja	n.b.	n.b.
3–8 g/kg Energex® [LOHMANN 1994]						
Xylan	233	0,020	ja	ja	ja	ja
β-Glucan	1370	0,140	ja	ja	n.b.	n.b.
0,05–0,2 g/kg Roxazyme® [JEROCH UND MÜLLER 1993]						
Xylan	12780	63,900	ja	ja	ja	ja
β-Glucan	2530	12,650	ja	ja	ja	n.b.

¹Im Rahmen dieser Arbeit mittels DNSS-Test bestimmt, ²Angenommen: 100% Extraktion u. 50% Aktivitätsverlust, n.b. = nicht bestimmbar

