

## **4. Materialien, Methoden und Versuchsdurchführung**

### **4.1 Charakterisierung der Enzyme**

In den Untersuchungen wurden kommerzielle Rohenzympräparate aus verschiedenen mikrobiellen Stämmen verwendet. Diese mußten zuvor charakterisiert werden, um z.B. die Größe ihrer Aktivität auf die Substrate Xylan und  $\beta$ -Glucan zu berücksichtigen, damit vergleichbare Enzymaktivitäten in den Bestimmungsmethoden eingesetzt werden konnten.

#### **4.1.1 Extraktionsmethode**

Feste Proben, wie Getreide, Futtermittelmischungen und gecoatete Enzympräparate mußten extrahiert werden, um Enzyme und störende Komponenten für Untersuchungen durch Überführung in die flüssige Phase zugänglich zu machen.

Enzympräparate, Getreide und Futtermittelmischungen wurden 1:5 in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 (bzw. 4,5) (s. Anhang) verdünnt und 30 min bei 30°C (bzw. 60°C bei gecoateten Enzymen) in einem Schüttelinkubator bei 120 upm inkubiert. Die Mischungen wurden anschließend 10 min bei 10000  $\times$ g zentrifugiert. Der pH-Wert des Überstands wurde gegebenenfalls auf 6,0 oder 4,5 justiert und für maximal 5 Tage bei zwischenzeitlicher Lagerung bei 4°C für Untersuchungen verwendet.

Gefrorene Digesta-Proben wurden im Wasserbad bei 40°C aufgetaut bis sie eisfrei waren. Nach 10 min Zentrifugation bei 10.000  $\times$ g wurde der Überstand abgenommen und in einer Eis/Wassermischung bis zum Gebrauch gelagert.

#### **4.1.2 Proteinbestimmung**

Zur Proteinbestimmung wurden 50  $\mu$ l Probe und 1 ml Bradford-Reagenz (Anhang) bei 590 nm gemischt und nach 5 min bei Raumtemperatur gegen 50  $\mu$ l Puffer und 1 ml Wasser als Blindwert gemessen. Die Methode wurde zuvor mit Rinderserumalbumin (RSA) kalibriert [BRADFORD 1976, HOLTZHAUER 1994].

#### **4.1.3 Enzymaktivität über die Bildung von Reduktionsäquivalenten**

Damit für alle Untersuchungen vergleichbare Enzymaktivitäten eingesetzt werden konnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Enzymaktivitäten aller Enzympräparate auf Basis der Bildung von Reduktionsäquivalenten [MILLER 1959, BAILEY 1988] bestimmt. Dabei wurde eine bestimmte Enzymmenge in Internationalen Einheiten angegeben. Eine Internationale Einheit (IE) ist definiert als die Enzymkonzentration, welche 1  $\mu$ mol Reduktionsäquivalente (als Glucoseäquivalente) pro Minute bei 50°C freisetzt. 20  $\mu$ l einer Enzymlösung wurden zu 200  $\mu$ l der auf

50°C vortemperierten 0,5%igen Substratlösung (5 mg/ml Haferspелzenxy lan (Fa. Roth, Karlsruhe), CMC, Lichenin (Fa. Sigma, Deisenhofen) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 bzw. 4,5, s. Anhang) pipettiert und bei 50°C für 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Dinitrosalicylsäurereagenz (Anhang) gestoppt und 5 min im Wasserbad gekocht, in Eiswasser auf Raumtemperatur gekühlt und mit 1 ml Wasser verdünnt. Die Absorption der Lösung wurde bei 530 nm im Spektralphotometer gemessen. Das DNSS-Reagenz wurde über eine Glucoseverdünnungsreihe kalibriert.

#### 4.1.4 Enzymreinigung

Um Enzyme aus flüssigen Rohpräparaten bzw. Extrakten zu trennen, wurden sie über eine Ultrafiltration (Amicon-Rührzelle mit einer 10 kD Polysulfonmembran von Sartorius oder Amicon, bzw. einer Minitan-Ultrafiltration mit einer 10 kD Polysulfonmembran von Millipore) aufkonzentriert und anschließend umgepuffert (s.u.). Die Umpufferung war notwendig, da die Extraktion der Enzympräparate bei pH 6,0 bzw. pH 4,5 erfolgten, aber die Trennsäulen (s.u.) mit anderen pH-Werten betrieben wurden. Die Enzympräparatlösungen wurden über eine Fast Protein Liquid Chromatographie Anlage (FPLC, Pharmacia, Schweden) aufgereinigt und -getrennt. Die Trennung der Proteinmoleküle erfolgte über eine mit einem Chromatographiemedium gepackte Säule. Sie wurden nach dem Prinzip der Gelfiltration nach ihrer Größe getrennt bzw. nach Ladung über Kationen- oder Anionenaustauscher getrennt.

Ein Filtrationsgel ist eine heterogene Phase, in welchem eine kontinuierliche flüssige Phase in den Poren einer festen Phase, der Gelmatrix, enthalten ist. In einem Filtrationsgel haben die Poren eine genau kontrollierte Größe. Gelmaterial hat eine hohe chemische und physikalische Stabilität und geringe adsorptive Eigenschaften. Gele werden aus vernetzten Polymeren hergestellt, wie z.B. das Sephadex aus vernetztem Dextran.

Die vernetzten Polymere in Ionenaustauschersäulen sind mit positiv bzw. negativ geladenen funktionellen Gruppen substituiert und trennen die Moleküle nach Ladung.

Es wurden Gelfiltrations- (Superdex 75 und 200, 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0, s. Anhang), Kationen- (Sephacryl, Sepharose mit  $\text{CH}_2\text{SO}_3^-$  als funktionelle Gruppe, 20 mM Trispuffer pH 8,1, s. Anhang) und Anionenaustauschsäulen (MonoQ HR mit  $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  als Anionenaustauscher, 20 mM Trispuffer pH 7,5–8,0, s. Anhang) verwendet (Pharmacia, Schweden).

Die Proteinfractionen wurden über UV-Absorption bei 315 nm identifiziert und fraktioniert gesammelt. Um zu entscheiden, ob eine Fraktion enzymatische Aktivität enthält wurden jeweils 15 µl entnommen und im Agardiffusionstest (s. Agardiffusionstest) auf Enzymaktivität getestet.

Anhand des Agardiffusionstests und der über die Laufzeit aufgezeichneten UV-Absorption der Proteinbanden (Proteinpeaks) wurde entschieden, welche enzymatisch aktiven Fraktionen einer Proteinbande zusammengefaßt bzw. verworfen wurden. Anschließend wurden die zusammengefaßten enzymatisch aktiven Fraktionen mittels Gelelektrophorese (s.u. Gelelektrophorese) auf Reinheit geprüft, vereinigt und gegebenenfalls über die FPLC weiter aufgereinigt.

#### **4.1.5 Bestimmung der Molmassen und Verteilung der aktiven Komponenten mit Hilfe der Gelelektrophorese**

Die Bestimmung der Molmassen der Proteine und die Detektion der aktiven Komponenten in den Enzympräparate wurde mittels einer SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Miniprotein IID Zelle der Fa. Biorad, München) in Anlehnung an LÄMMLI [1970] und der Zymogrammtechnik durchgeführt [WOLF ET AL. 1995]. Die SDS/PAGE-Gele (s. Anhang) wurden bis auf den Austausch von 1 ml H<sub>2</sub>O gegen 1 ml Substratlösung (0,05% Lichenin, Haferspelzenxylylan oder Carboxymethylcellulose (CMC)) nach Herstellerangabe hergestellt. 20 µg Protein wurde auf die einzelnen Bahnen des Gels aufgetragen. Die Proteinkonzentration wurde zuvor mit Hilfe des Bradfordtests bestimmt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Enzympräparate wurde das SDS aus den Gelen unter gleichmäßiger Agitation (wippen) mit 50%igem Ethanol zweimal für 30 min ausgewaschen. Um die Proteine zu renaturieren wurden die Gele mit 20 mM Natriumacetatpuffer, pH 6,0 ebenfalls unter gleichmäßiger Agitation zweimal für 30 min gewaschen und anschließend in 20 mM Natriumacetatpuffer, pH 6,0 bei 40°C für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gele mit 0,2%iger Kongorotlösung 10 min und danach zweimal für 10 min mit 1 M NaCl-Lösung überschichtet. Kongorot färbt nur die Bereiche des Gels an, welches hochmolekulares Substrat enthält. Durch enzymatische Aktivität wurde hochmolekulares Substrat hydrolysiert, so daß im Gel Zonen entstehen, die nicht vom Kongorot angefärbt werden konnten. Zur Bestimmung der Molmassen wurden Proteinstandards (Sigma, Pharmacia) mitgeführt, die nach einer Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar wurden. Mit dieser Doppelfärbetechnik wurden Zymogramme hergestellt, welche die Zuordnung der aktiven Komponenten zu den einzelnen Gewichtsstandards ermöglichten. Damit konnte außerdem konnte die Reinheit der aufgetrennten Enzymfraktionen und die Anzahl der Banden mit enzymatischer Aktivität innerhalb der verschiedenen Enzympräparate beurteilt werden.

#### **4.1.6 Bestimmung der pH-Optima**

Die pH-Optima wurden mittels DNSS-Test in verschiedenen Puffern bestimmt (Tab. 2). Zur Bestimmung der pH-Optima konnte nicht im gesamten Bereich der Phosphatpuffer bestimmt werden, da im Phosphatpuffer die Ca<sup>2+</sup>-Ionen ausgefallen wären.

Tabelle 2: Puffer\* zur Bestimmung der pH-Optima

pH	Puffer
3,0–4,5	20 mM Glycinpuffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub>
4,0–5,5	20 mM Natriumacetatpuffer, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,02% NaN <sub>3</sub>
6,0–8,0	50 mM Phosphatpuffer

\*siehe Anhang

#### 4.1.7 Temperaturverhalten der Enzympräparate

Enzymlösungen wurden mit pH 6,0 bzw. pH 4,5 20 mM Natriumacetatpuffer auf 0,5 IE/ $\mu$ l verdünnt. 20  $\mu$ l Enzymlösung (10 IE) wurden in 200  $\mu$ l 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 bzw. pH 4,5 für 30 min bei 60° inkubiert. Die Temperaturstabilität wurde anschließend durch Bestimmung der Restaktivität mittels des DNSS-Tests (s. 4.1.3) ermittelt.

#### 4.1.8 Bestimmung der isoelektrischen Punkte

Die mittels der FPLC aufgereinigten Proben wurde in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 bzw. pH 4,5 untersucht. Dabei wurden Probenvolumen von 20  $\mu$ l mit einer Proteinkonzentration von 10  $\mu$ g/ml (Bradford-Test) verwendet. Die isoelektrischen Punkte wurden durch isoelektrische Focussierung (Pharmacia LKB Multipor 2) mit Ampholine PAG-Platten (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers ermittelt.

#### 4.1.9 Bestimmung der Hydrolysemuster mittels HPLC

Die enzymatischen Hydrolyseprodukte wurden modifiziert nach Puls [PULS ET AL. 1991] hergestellt und charakterisiert. Anstelle von Birkenholz-Acetyl-4-O-Methylglucuronxylyan wurden Haferspelzenxylyan bzw. -derivate mit anderen Enzympräparaten hydrolysiert.

1%ige Haferspelzenxylynderivatelösung (unbehandeltes, ultraschallbehandeltes, autoklaviertes, carboxymethyliertes Haferspelzen) wurde im Schüttler unter ständiger Bewegung 16–18 h bei Raumtemperatur mit 1 bzw. 100 IE Enzym in 1 ml 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 5,4 inkubiert. Die hydrolysierten Haferspelzenxylynderivate wurden über einen 0,45  $\mu$ m Acetatfilter (Fa. Roth) filtriert und in die HPLC gegeben.

Das hydrolysierte Haferspelzenxylyan wurde über eine Anionenaustauschchromatographie mit einer HPLC PA1 Säule (Dionex, Idstein) durch Hydroxid- und Acetateluenten getrennt und über gepulste amperometrische Detektion identifiziert. Eluent A war 0,1 N NaOH, Eluent B war 0,1 N NaOH und 1 N NaOAc. Die Laufzeit betrug 45 min. Im Gradientenprogramm wurde die Konzentration von Eluent B über die Laufzeit von 5 auf 100% erhöht (s. Anhang).

Als Referenzsubstanz diente sauer teilhydrolysiertes Haferspelzenxylan (30 min, 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Raumtemperatur). Die sauer hydrolysierten Haferspelzenxylanderivate wurden mit ca. 1%iger Ba(OH)<sub>2</sub> Lösung bis auf pH 7 neutralisiert, über ein 0,45 µm Acetatfilter filtriert und in die HPLC gegeben. Die hydrolysierte Referenzsubstanz wurde mit Standardlösungen (10 mg/l) von Xylose, Glucose und Arabinose (Fa. Sigma, Deisenhofen) charakterisiert. Die höherpolymerisierten Xylosen wurden durch Abzählen ausgehend von dem Xylosestandard identifiziert.

## 4.2 Aktivitätsbestimmung in komplexen Medien

Um den Einfluß von Futtermittelmischungen und Getreiden auf Enzymaktivitätsbestimmungen zu untersuchen wurden Futtermittelmischungen zur Ferkelaufzucht (A), Geflügelmast (G) und Mischungen mit dem Hauptbestandteil Gerste (B), Weizen (W), Triticale (T) und Roggen (R) extrahiert, Getreideextrakte wurden aus Weizen, Gerste und Hafer undefinierter Herkunft hergestellt.

Digestaprobe wurden aus verschiedenen Abschnitten des Verdauungstraktes von Schweinen und Broilern entnommen, die mit Futtermischungen mit oder ohne Enzymzusatz gefüttert wurden.

### 4.2.1 Verdünnung der Enzymlösungen

Die Enzympräparate (s. Extraktionsmethode) wurden bis auf das 10fache der gewünschten Endkonzentration in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 bzw. pH 4,5 verdünnt. Der letzte Verdünnungsschritt (1:10) erfolgte in dem Medium (20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 oder 4,5 bzw. Futtermittel-, Getreideextrakt oder Digestaflüssigkeit), in dem die Enzymaktivitätsbestimmung durchgeführt werden sollte.

### 4.2.2 Agardiffusionstest

Das angewandte Verfahren basiert auf Angaben von WOOD (1988), SIMON (1994), EDNEY ET AL. (1986). Es wurde zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in Digesta und Futtermittelproben verwendet. Dazu wurden 0,5 mg/ml Substrat (Xylan, β-Glucan, Lichenin, CMC) in einer 1,1%igen Agar-Lösung in 20 mM Natriumacetatpuffer, 10 mM CaCl<sub>2</sub> bei pH 6,0 bzw. pH 4,5 durch Aufkochen in der Mikrowelle (600 W) gelöst. Sobald die Lösung klar war, wurde sie auf ca. 70°C abgekühlt und in Schalen gegossen. (Petrischalen aus Polycarbonat, 90 mm Durchmesser, 10 ml Substratlösung, 50 µl Enzymlösung; Polycarbonatschalen 25 cm × 25 cm, 110 ml Substratlösung, 70 µl Enzymlösung; Plexiglasschalen mit drei Teilen à 20 cm × 10 cm, je 100 ml Substratlösung, 70 µl Enzymlösung) Nach dem Erstarren des Agars wurden mittels eines Korkbohrers 6 mm große Löcher in die Agarplatten gestanzt, in welche die Proben bzw. die Kontrollösung

pipettiert wurden. Die Schalen wurden abgedeckt und 24 h bei 40°C inkubiert. Anschließend wurde die Agarplatte mit 0,2%iger Kongorotlösung 10 min unter Schwenken gefärbt und danach durch Waschen mit 1 M NaCl-Lösung wieder entfärbt. Kongorot färbt nur die Bereiche der Platte an, die hochmolekulares Substrat enthalten. Durch enzymatische Aktivität entstehen Zonen mit hydrolysiertem Substrat, so daß um die Löcher, die mit Enzymlösung gefüllt waren, runde Lysezonen entstanden. In den Plexiglasschalen wurden die Lysezonen durch den planaren Boden gleichmäßiger. Der Durchmesser der Lysezonen wurden zunächst visuell mittels eines Lineals ausgemessen. Später wurde diese relativ unpräzise Messung durch eine Flächenmessung mittels eines Photodokumentationsystems (Raytest, Straubenhardt) ersetzt. In der Auswertung wurde die Fläche der Lysezonen gegen den Logarithmus der Enzymkonzentration (0,005–1 IE/ml) aufgetragen.

### 4.2.3 Viskositätsmessung

Das Substrat wurde aufgeköcht, auf 40°C temperiert und die Viskosität der Substratlösung bestimmt. Dann wurde Substratlösung mit Enzympräparat in einem Warmluftschüttelinkubator (Heidolph Unimax 1000/1010) inkubiert. Als Blindprobe wurde eine Substratlösung mit dem gleichen Volumen Puffer ohne Enzymzusatz versetzt. Die Viskositätssenkung der mit Enzympräparat inkubierten Substratlösung gegenüber der Substratlösung ohne Enzymzusatz wurde mittels eines Rotationsviskosimeters (Brookfield Cone/Plate LVDL-II+, Lorch) nach einer definierten Zeit bestimmt.

Zur Bestimmung von  $\beta$ -Glucanasen wurden eine 1%ige Licheninlösung und eine 2 bzw. 1%ige Gersten  $\beta$ -Glucanlösung als Substrat benutzt. Die Substratlösungen wurden wie folgt vorbereitet:

1 g Lichenin (Sigma, Deisenhofen) wurden in 10 ml Wasser suspendiert, 10 ml 2 M NaOH zugefügt und die Suspension für 15 min gerührt. Die Lösung wurde mit 1 M Natriumacetatpuffer, pH 6,0 verdünnt, der pH-Wert auf pH 6,0 mit Essigsäure eingestellt und anschließend das Volumen auf 100 ml justiert.

1 bzw. 2 g Gersten  $\beta$ -Glucan (Megazyme, Irland) wurden in 100 ml 20 mM Natriumacetatpuffer, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 6,0 gelöst. Die Suspensionen wurde in einem Wasserbad bei 40°C geschüttelt, bis sie bei dieser Temperatur partikelfrei war.

Zur Bestimmung von Xylanasen wurde kommerziell erhältliches und modifiziertes Haferspelenxylan (Fa. Roth, Karlsruhe) verwendet. Es wurde dazu den unter Substratmodifikation be-

schriebenen Behandlungen unterworfen (autoklavieren, carboxymethylieren, ultraschallbehandeln) und als 4–5%ige Lösung in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 und 4,5 verwendet.

Zur Enzymaktivitätsbestimmung per Viskositätsabsenkung wurden verschiedene Methoden ausprobiert. Anfangs wurden 100 µl Enzymprobe zu 900 µl Substrat gegeben und die Viskosität nach 5 min Inkubation bei 40°C gemessen. Eine zweite Enzymprobe wurde 35 min inkubiert. Die Differenz zwischen der 5 min und der 35 min Inkubation wurde gegen die Enzymkonzentration aufgetragen. Als zweites wurde die Viskosität nach 5 bzw. 35 min Inkubation aus derselben Probe bestimmt. Sie wurde dazu nach dem ersten Ablesen wieder in den Inkubator getan. Als dritte Alternative wurden 500 µl Substrat und 100 µl Enzymlösung für 0,5 bzw. 1 h bei 40°C inkubiert. Um den Verlauf der enzymatischen Hydrolyse anhand der Viskositätssenkung zu verfolgen, wurden 50 µl Enzym- und 500 µl Substratlösung im Viskosimeter gemischt und die Viskosität alle 30 s abgelesen [VAHJEN ET AL. 1997].

#### 4.2.4 Chromogene Substrate

Chromogene Substrate zur Enzymbestimmung bestehen aus einer enzymatisch hydrolysierbaren Komponente und einem Farbstoff. Die hydrolysierbaren Komponenten sind verschiedene Haferspелzenxylanderivate (autoklaviert, ultraschallbehandelt, carboxymethyliert und unbehandelt),  $\beta$ -Glucan oder Arabinoxylan. In dieser Arbeit wurden die chromogenen Substrate nach der Farbstoffkomponente in Substrate mit Reaktivfarbstoffen (überwiegend kovalent-gebundenen), anionischen und kationischen Farbstoff eingeteilt.

Chromogene Substrate wurden mit dem jeweiligen Enzympräparat in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 oder 4,0 bzw. Getreide-, Futtermittel- oder Digestaflüssigkeiten inkubiert und die Differenz aus freigesetztem Hydrolysat mit Farbstoff nach Abtrennung des unhydrolysierten gefärbten Substrats photometrisch bestimmt. Enzymaktivitätsbestimmungen mit chromogenen Substraten, die mit Reaktivfarbstoffen (Remazol Brilliant Blue, etc.) gekoppelt sind, wurden mit Ethanol gestoppt. Das Ethanol diente gleichzeitig als Fällungsmittel für das nicht hydrolysierte hochmolekulare Substrat. Bei den kommerziellen Substraten wurde nach Angaben des Herstellers (Megazyme, Irland) die enzymatische Reaktion durch Verschiebung des pH-Wertes mit Tris-Lösung gestoppt und nicht hydrolysiertes Substrat durch Filtration abgetrennt. Die enzymatische Reaktion mit dem kationischen Farbstoff (Rutheniumrot) wurde durch Kühlung auf Eis gestoppt und nicht hydrolysiertes Substrat abfiltriert. Die Freisetzung der ionischen Farbstoffe durch enzymatische Reaktion kann nur direkt im Photometer verfolgt werden.

#### 4.2.4.1 Substrate mit Reaktivfarbstoffen

Die verschiedenen modifizierten Haferspелzenxylane (ultraschallbehandelt, autoklaviert, carboxymethyliert) wurden mit folgenden Reaktivfarbstoffen der Fa. Sigma (Deisenhofen) gekoppelt (z. T. kovalent gebunden: Remazol Brilliant Blue R, Reaktivgelb (Reactive Yellow 86), Reaktivorange (Reactive Orange 14), Reaktivgrün (Reactive Green 19), Reaktivrot (Reactive Red 2), Reaktivschwarz (Reactive Black 5), Reaktivviolett (Remazol Brilliant Violet 5R), Cibacron Blue 3 GA, Basilin Blue E-3G, Azure A, Azure B (s. chemische Substratmodifikation). 0,5, 6 bzw. 20 mg/ml chromogenes Substrat wurden in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 gelöst bzw. suspendiert und gegebenenfalls soweit weiter verdünnt, bis die Messung (Wellenlänge s. Tab. 47) innerhalb des linearen Bereichs des Lambert-Beerschen Gesetzes durchgeführt werden konnte. Die Lösungen wurden auf 30, 40 bzw. 50°C vortemperiert. 275 µl Enzymlösung (25 µl Enzymlösung und 250 µl Natriumacetatpuffer bzw. Futtermittelextrakt) wurde in einem Reaktionsgefäß mit 250 µl chromogener Substratlösung vermischt und 10, 20, 30, 60, 120, 180 min in einem Wasserbad bei 30, 40 bzw. 50°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol gestoppt und die Mischung 10 min bei 9000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Küvette pipettiert und die Absorption des freigesetzten Farbstoffs in einem auf 30, 40 bzw. 50°C temperierten Probenkarussell gegen den gleichbehandelten Blindwert gemessen. Der Blindwert bestand aus 250 µl chromogener Substratlösung und 275 µl Natriumacetatpuffer bzw. 250 µl chromogener Substratlösung, 250 µl Futtermittelextrakt und 25 µl Natriumacetatpuffer.

Zur Bestimmung von Xylanase- und β-Glucanaseaktivitäten wurden zwei kommerzielle chromogene Substrate: Xylazyme und β-Glucazyme Tabletten bzw. Lösungen (Megazyme, Irland) eingesetzt. Die Messung der Enzymaktivität durch die Freisetzung von gefärbten Hydrolyseprodukten wurde wie bei MEGAZYME 1995 beschrieben, durchgeführt. Für die Tablettentests wurden 500 µl Probe für 10 min bei 40°C vorinkubiert. Nach Zugabe einer chromogenen Substrat-tablette je Probe wurde die Reaktionsmischung für 10 min bei 40°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml 2%iger Trislösung gestoppt. Die Absorption des freigesetzten gefärbten Hydrolysats wurde nach Filtration bei 590 nm im Photometer gegen den gleichbehandelten Blindwert gemessen.

Die Flüssigtests wurden durch Zugabe von 50 µl Probe zu 450 µl 1%iger chromogener Substratlösung einstündiger Inkubation bei 50°C und Fällung des farbstoffgekoppelten Substrats mit 1 ml Ethanol durchgeführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000 ×g wurde die Absorption des freigesetzten Farbstoffs im Überstand bei 590 nm gegen den gleichbehandelten Blindwert im Photometer gemessen.

#### 4.2.4.2 Substrate mit ionischen Farbstoffen

Die verschiedenen modifizierten Haferspелzenxytan (ultraschallbehandelt, autoklaviert, carboxymethyliert) wurden ionisch nach WOOD, FULCHER [1978] mit folgenden Farbstoffen der Fa. Sigma (Deisenhofen) gekoppelt: Kongorot, Calcufluor, Trypanblau, Brilliant Yellow (s. chemische Substratmodifikation). Die enzymatische Freisetzung der ionischen Farbstoffe wurde als Zeitverlaufsmessung (15–30 min) in einem Photometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Schweden) mit einem auf 50°C temperierten Probenkarussell verfolgt. 0,5 mg/ml chromogenes Substrat wurde in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 gelöst bzw. suspendiert und gegebenenfalls soweit weiter verdünnt, daß die Messung innerhalb des linearen Bereichs des Lambert–Beer'schen Gesetzes durchgeführt werden konnte. Die Lösung und der Blindwert wurde auf 50°C vortemperiert. Dann wurden 50 µl Enzymlösung (0,5 bzw. 1 IE) in mit 500 µl Natriumacetatpuffer bzw. Futtermittlextrakt in der Küvette mit 500 µl chromogener Substratlösung vermischt und der Extinktionsverlauf gegen den gleichbehandelten Blindwert aufgenommen. Der Blindwert bestand aus 500 µl chromogener Substratlösung und 550 µl 20 mM Natriumacetatpuffer bzw. 500 µl chromogener Substratlösung, 500 µl Futtermittlextrakt und 50 µl Natriumacetatpuffer.

#### 4.2.4.3 Substrat mit kationischem Farbstoff (Rutheniumrot)

Die Enzymaktivitätsbestimmungen mit Rutheniumrot erfolgten nach der Methode von Rescigno [RESCIGNO ET AL. 1994] mit dem Unterschied, daß Carboxymethylxytan (CMX) anstelle von Carboxymethylcellulose verwendet wurde. 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 wurden mit 1 mM EDTA versetzt, um freie Rutheniumkationen durch Komplexbildung vor Oxidation zu schützen. Eine Lösung mit 3 mg/ml Rutheniumrot–Carboxymethylxytan (RR–CMX) wurde auf 40°C vortemperiert. 550 µl Enzymlösung in 20 mM Natriumacetatpuffer bzw. Futtermittlextrakt wurde in einem Reaktionsgefäß mit 500 µl RR–CMX–Lösung gemischt und 30 min bei 40°C auf dem Wasserbad inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Kühlung auf Eis gestoppt. Dann wurde über einen 0,45 µm Celluloseacetatfilter in eine Küvette filtriert und die Absorption des freigesetzten Farbstoffs bei 535 nm in einem auf 40°C temperierten Probenkarussell gegen einen gleichbehandelten Blindwert bestimmt. Der Blindwert bestand aus 500 µl RR–CMX–Lösung und 550 µl 20 mM Natriumacetatpuffer bzw. 500 µl RR–CMX–Lösung, 500 µl Futtermittlextrakt und 50 µl Natriumacetatpuffer.

#### 4.2.5 Farbreaktionsmethode

Enzyme hydrolysieren ultraschallbehandeltes Haferspелzenxytan. Die Hydrolyseprodukte werden mit Reaktivfarbstoffen, wie z.B. Reaktivgrün umgesetzt. Die Differenz zwischen umgesetzten und freien Farbstoff ist ein Maß für die enzymatische Aktivität.

Futtermittelextrakt bzw. Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 und 0,5%iges Ultraschallxylan (UX) in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 wurden auf 40°C vortemperiert. 200 µl Natriumacetatpuffer bzw. 200 µl Futtermittelextrakt, 200 µl UX-Lösung und 20 µl Enzymlösung wurden in einem Reaktionsgefäß für 1 oder 2 h bei 40°C inkubiert. Dann wurden 50 µl 4 N NaOH zugefügt, vermischt und 100 µl 0,5%ige Farbstofflösung (Reaktivgrün) zugefügt, die Mischung für 5 min im Wasserbad gekocht und im Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden 1 ml Ethanol zugefügt und 10 min bei 9000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Küvetten dekantiert und die Extinktion bei 650 nm gegen die gleichbehandelte Blindprobe bestimmt. Die Blindprobe bestand aus 200 µl Natriumacetatpuffer oder 200 µl Futtermittelextrakt und 200 µl UX-Lösung, 20 µl Natriumacetatpuffer und 100 µl Farbstofflösung.

### 4.3 Substratmodifikationen

Substrate zur Enzymbestimmung sollten so modifiziert werden, daß der Nachteil der Chargenabhängigkeit ausgeglichen, die Nachweisempfindlichkeit verbessert und zuverlässigere, vergleichbarere Ergebnisse erreicht werden. Die Substratmodifikationen wurden in physikalische, chemische und biologische Modifikation unterteilt.

#### 4.3.1 Physikalische Substratmodifikation

Ein Ziel der physikalischen Modifikationen war die Löslichkeitsverbesserung. Als gelöstes Substrat wurde im Rahmen dieser Arbeit der Anteil definiert, der sich nach 10 min Zentrifugation bei 12000 ×g nicht sedimentierte.

Zur Oberflächenvergrößerung wurden 1,0 g Haferspelzenxylan mit 5,7 ml Ethanol auf einem Magnetrührer verrührt, anschließend 90 ml H<sub>2</sub>O zugegeben und unter ständigem Rühren aufgekocht. Nach dem Aufkochen wurde noch ca. 30 min ohne Wärmezufuhr weitergerührt [MC-CLEARY 1995]. Der nicht gelöste Anteil wurde nach dem Abzentrifugieren über Trockensubstanz (TS) (s. Substratcharakterisierung) bestimmt.

Weiterhin wurde versucht, 1–4% unbehandeltes Haferspelzenxylan durch Kochen in der Mikrowelle (2–4 min, 360 W) auf der Heizplatte (8–24 h) im Rückfluß (24 h, 48 h) in Wasser bzw. in 20 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0 zu lösen. Anschließend wurde 10 min bei 12000 ×g zentrifugiert und in Überstand und Zentrifugat getrennt und der gelöste Anteil über die Trockensubstanz bestimmt.

2 g bzw. 2,5 g Haferspelzenxylan (unbehandelt bzw. carboxymethyliert o. 0,5 g β-Glucan) wurden in 55 ml Wasser bzw. 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 suspendiert (ca. 5 ml Flüssigkeitsverlust), durch Aufkochen in der Mikrowelle (2 min, 360 W) suspensiert, in ein 50 ml Pla-

stikgefäß gefüllt und mit einem Bandelin Sonopuls GM 70 (70 W, 20 kHz) mit 70 Zyklen 1,5 h ultrabeschallt. Anschließend wurde 10 min bei 12000 ×g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in der Mikrowelle erhitzt und heiß über einen Glasfaserfilter (Sartorius) und einen 0,45 µm Acetatfilter (Fa. Sartorius o. Roth) filtriert, um eine homogene Lösung zu erhalten. Das gelöste Haferspelzenxylan wurde direkt aus der Lösung oder mittels des doppelten Volumens Ethanol bzw. Isopropanol gefällt, anschließend gefrier- oder luftgetrocknet, um als Substrat für Enzymaktivitätsbestimmungen eingesetzt werden zu können.

Unbehandeltes Haferspelzenxylan wurde im Trockenschrank bei 105°C 24 h getrocknet (getempert), um eingelagertes Wasser zu entfernen.

4,0 g bzw. 5,0 g unbehandeltes Haferspelzenxylan wurden in ca. 50 ml Wasser suspendiert und 30 min bei 121°C autoklaviert. Es entstanden zwei Phasen. Der Überstand wurde abgenommen, und 10 min bei 12.000 ×g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in 1–3 ml Wasser suspendiert und erneut autoklaviert. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Nach der dritten Autoklavbehandlung und Zentrifugation entstanden drei Phasen. Die obere, flüssige Phase wurde als P1, die mittlere Phase als P2, die untere, feste Phase als P3 bezeichnet.

Die verschieden behandelten Haferspelzenxylanmodifikationen wurden über eine Gelfiltration (FPLC, Sephacryl 400 HR, Pharmacia, s. Unterpunkt Enzymreinigung) in Fraktionen von verschiedenen Molekülgrößen getrennt oder stufenweise über Ultrafilter (Fa. Amicon, Beverly) getrennt, bzw. aufkonzentriert. Für Proteine besitzen die Filter folgende Stufen: 300 kD (Kilodalton), 100 kD, 30 kD, 20 kD, 10 kD, 5 kD.

## **4.3.2 Chemische Substratmodifikation**

### **4.3.2.1 Löslichkeitsverbesserung**

Um 1–4% unbehandeltes Haferspelzenxylan in Lösung zu bringen, wurde die Suspension aufgekocht (Mikrowelle, Heizplatte, 8–24 h im Rückfluß) bzw. 24 h bei Raumtemperatur in 0,1–4 N NaOH, 0,1–4 N KOH, ca. 2 N Ba(OH)<sub>2</sub>, 0,1 N Essigsäure oder 50%iges Ethanol gerührt. Weiterhin wurde versucht 1–4%iges Haferspelzenxylan in 2–12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10–50%iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2–20%iger HCl 5, 30, 60 min bzw. 4–24 h lang zu hydrolysieren.

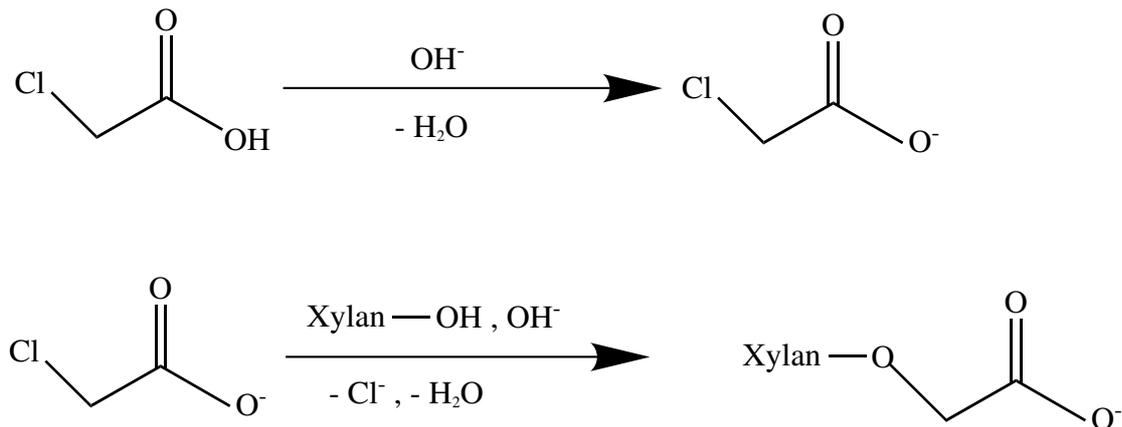


Abbildung 3: Modellvorstellung Carboxymethylierung von Xylan

Um die Löslichkeit von Haferspelzenxylan in Wasser bzw. Puffer zu verbessern, wurde es carboxymethyliert. Es wurde unbehandeltes und ultraschallbehandeltes Haferspelzenxylan carboxymethyliert. Es wurden einfach, doppelt und maximal carboxymethyliert. Das ultraschallbehandelte Haferspelzenxylan wurde zuvor mit dem doppeltem Volumen Isopropanol aus der Lösung gefällt und an der Luft getrocknet. 20 g Haferspelzenxylan wurden in einem Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Rührer und Tropftrichter vorgelegt. Es wurden 0,2 g Monochloressigsäure (bzw. 0,4 g für die doppelte und 2 g für die maximale Carboxymethylierung) in 52 ml bzw. 100 ml Ethanol gelöst und zu dem Haferspelzenxylan gegeben. Die Lösung wurde gerührt und auf Rückflußtemperatur erhitzt (80 °C). Eine Lösung von 0,65 g (1,3 bzw. 6,5) NaOH in 8 (16 bzw. 80) ml Wasser und 72 (144 bzw. 300) ml Ethanol wurde langsam zu der am Rückfluß kochenden Lösung gegeben. Nach Beendigung der Zugabe wurde 15 min weiter gekocht. Nach Abkühlen wurde das Produkt abfiltriert und mit 80%igem Ethanol gewaschen (Abb. 3) [McCLEARY 1982].

Zur Molmassenbestimmung von Haferspelzenxylan und -derivaten in der GPC (Gelpermeationschromatographie) muß Haferspelzenxylan acetyliert werden, damit es in THF (Tetrahydrofuran) löslich wird. Die Acetylierung wurde auch zur Substratderivatisierung durchgeführt, damit ein intramolekulare Abstandhalter in das Makromolekül eingeführt wird. Zur Acetylierung wurden verschiedene Bedingungen ausprobiert.

Zur Acetylierung mit Essigsäureanhydrid wurden 1,0 g Haferspelzenxylan in 25 ml Formamid bei 100°C gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 40°C wurden 25 ml Pyridin zugefügt und die Mischung in den ersten Versuchen auf 0 oder 10°C durch Eis/Kochsalzmischung gekühlt bzw. in den nächsten Versuch auf 60 oder 100°C im Siliconbad erhitzt. Unter Rühren wurde anschließend 20 ml Essigsäureanhydrid langsam zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde noch 2–3 h bei der gewählten Reaktionstemperatur (0, 10, 60 oder 100°C) weitergerührt. Dann wurde das Reakti-

ongemisch in Eis gegossen, das ausgefällte Acetat über eine 17D3–Nutsche abgesaugt, mit Aceton aufgenommen, abzentrifugiert, wieder in Wasser ausgefällt und an der Luft getrocknet.

Zur Acetylierung mit Acetylchlorid wurden 1,0 g Haferspelzenxylylan in 25 ml Formamid bei 100°C gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 40°C wurden 25 ml Pyridin zugefügt und die Mischung in den ersten Versuchen auf 0 oder 10°C durch Eis/Kochsalzmischung gekühlt bzw. in den nächsten Versuchen auf 60°C im Siliconbad erhitzt. Unter Rühren wurde anschließend 40 ml Acetylchlorid langsam zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde noch 2–3 h weitergerührt bei der entsprechenden Reaktionstemperatur (0, 10 oder 60°C) weitergerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch in Eis gegossen, das ausgefällte Acetat über eine 17D3–Nutsche abgesaugt, mit Aceton aufgenommen, abzentrifugiert, wieder in Wasser ausgefällt und an der Luft getrocknet.

Der Versuch wurde bei Raumtemperatur mit Benzoylchlorid wiederholt, um ein Chromophor in das Xylanmolekül einzuführen, damit es in der GPC (Gelpermeationschromatographie) besser detektiert werden konnte.

#### 4.3.2.2 Farbstoffkopplung

Anionische Farbstoffe:

Die Farbstoffkopplung mit anionischen Farbstoffen wurde nach WOOD, FULCHER (1978) durchgeführt. Dazu wurde 1 g Haferspelzenxylylan (ultraschallbehandelt, autoklaviert, unbehandelt, carboxymethyliert, enzymatisch) in 100 ml Carbonatpuffer pH 10,0 (s. Anhang) gelöst und mit jeweils 0,1 g der verschiedenen Farbstoffe (Kongorot, Calcufluor, Trypanblau, Brilliant Yellow, alle von Fa. Sigma, Abb. 4 und 5) 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung in 200 ml Isopropanol gegossen und über einen Glasfaserfilter bzw. eine Nutsche (17D3) abfiltriert. Der abfiltrierte Niederschlag wurde mehrfach mit Carbonatpuffer pH 10,0 und anschließend mit 60%igem Isopropanol (bestehend aus Carbonatpuffer pH 10,0 und Isopropanol) gewaschen und an der Luft getrocknet.

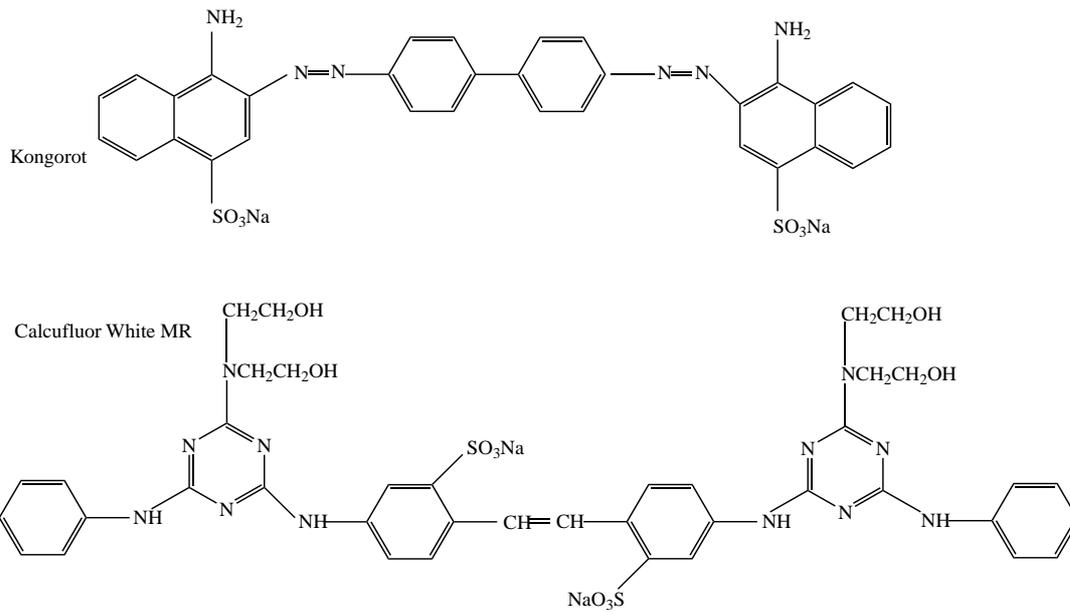


Abbildung 4: Strukturformeln der ionischen Farbstoffe Kongorot und Calcufluor [WOOD, FULCHER 1978]

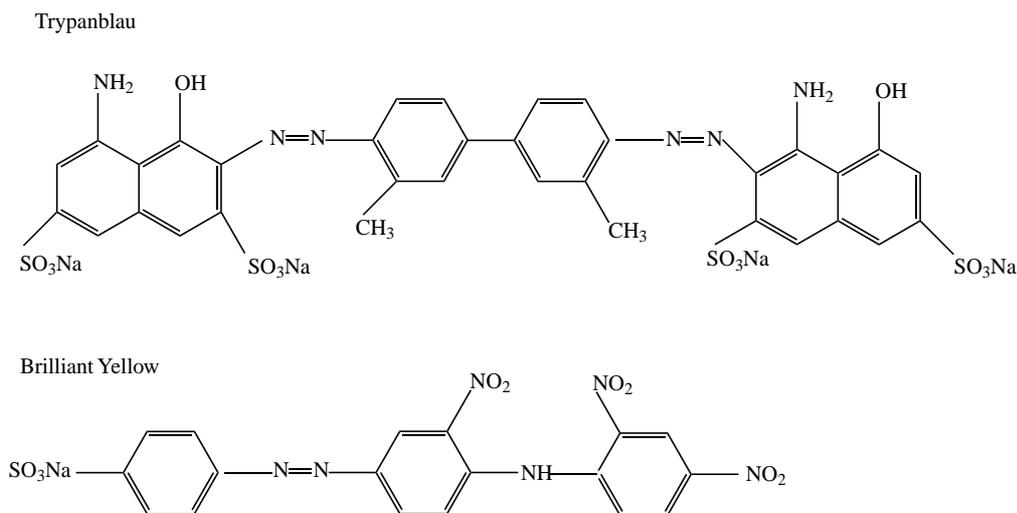


Abbildung 5: Strukturformeln der ionischen Farbstoffe Trypanblau und Brilliant Yellow [WOOD, FULCHER 1978]

#### Kationischer Farbstoff:

Zur Verwendung des kationischen Farbstoffs Rutheniumrot (Abb. 6) als chromogene Komponente wurde nach Rescigno et al. 1994 mit dem Unterschied vorgegangen, daß anstelle von Carboxymethylcellulose Carboxymethylxylan eingesetzt wurde, um ein Substrat zur Detektion von Xylanasen zu erhalten. 1 g Carboxymethylxylanlösung (CMX, unbehandelt und ultraschallbehandelt) wurden in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst und 10 ml 4 mg/ml Rutheniumrotlösung tropfenweise gemischt und für 4 Stunden gerührt. Die Suspension wurde bei 9000 ×g 10 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Der Überstand wurde in das dreifache Volumen Aceton ge-

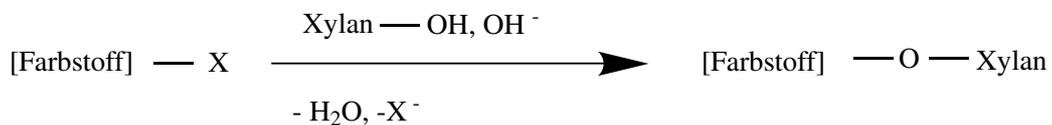
gossen und gerührt. Das ausgefallene Aggregat wurde über eine 17D3 Nutsche abgesaugt und mit Aceton solange gewaschen, bis das Filtrat farblos war. Das Filtrat wurde über Nacht bei 40°C getrocknet.



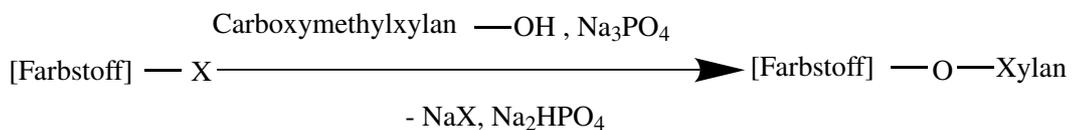
Abbildung 6: Rutheniumrot [Sigma 1997]

Reaktivfarbstoffe:

0,2 g Reaktivfarbstoff (Remazol Brilliant Blue R, Reactive Black 5, Reaktivgrün 19, etc., Abb. 8–11) wurden zu einer Lösung von 2 g Haferspelzenxylylan (ultraschallbehandelt, autoklaviert, unbehandelt) in 30 ml Wasser gegeben und über einen Zeitraum von 5 min 10 ml 1 mg/ml  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  zugetropft. Die Mischung wurde durch Zugabe von 10 ml 0,1 g/ml NaOH alkalisiert und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Das gefärbte Produkt wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an Ethanol gefällt. Das Produkt wurde mit einer Mischung aus Ethanol und einer 0,05 M wässrigen Natriumacetatlösung im Verhältnis 2:1 gewaschen, bis es farblos war. Anschließend wurde es mit einem Ethanol–Wasser–Gemisch im Verhältnis 4:1, mit 100%igen Ethanol und zuletzt mit Aceton gewaschen, anschließend an der Luft getrocknet (vgl. Reaktionsgleichung Abb. 7) [BIELY 1985, 1988].



X = Cl, OH,  $\text{OSO}_3\text{Na}$

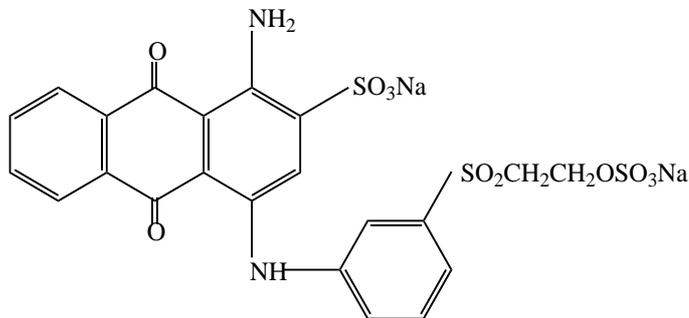


X = Cl, OH

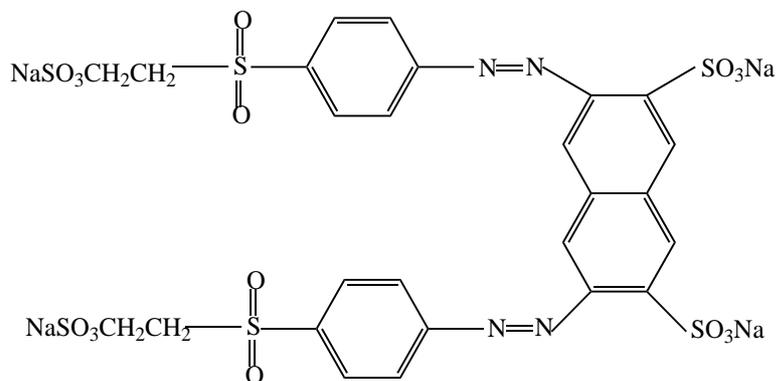
Abbildung 7: Modellvorstellung: Reaktionsschema Carboxymethylxylylan und unbehandeltes Xylylan mit Reaktivfarbstoffen

2 g carboxymethyliertes Haferspelzenxylylan wurden in 20 ml Wasser durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und auf 60°C temperiert. 0,4 g Farbstoff und 2 g Natriumsulfat wurden unter Rühren zugegeben und 30 Minuten weitergerührt. Weiterhin wurden 0,4 ml 0,5 g/ml  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  zugegeben. Nach weiteren 30 min Rühren wurde die Lösung in 40 ml sauren Ethanol (5%ige

HCl in Ethanol) gegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, an der Luft getrocknet und in 20 ml Wasser durch Aufkochen erneut gelöst. Der Fällungsschritt wurde zweimal wiederholt, um den ungebundenen Farbstoff aus dem Substrat zu entfernen (s. Reaktionsgleichung Abb. 7) [McCLEARY 1982].

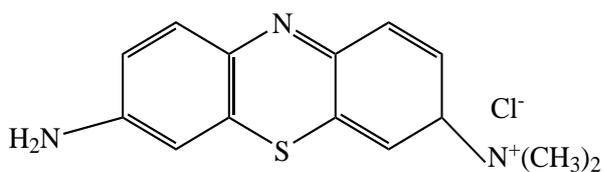


Remazol Brilliant Blue R

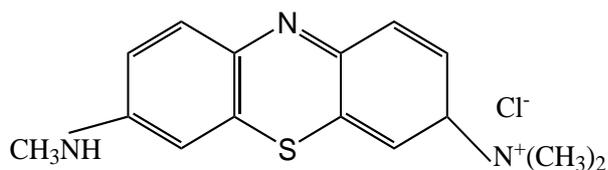


Reactive Black 5

Abbildung 8: Reaktivfarbstoffe Remazolbrilliant Blue R und Reaktivschwarz [POUCHERT 1985]



Azurin A



Azurin B

Abbildung 9: Azurin A und B [POUCHERT 1985]

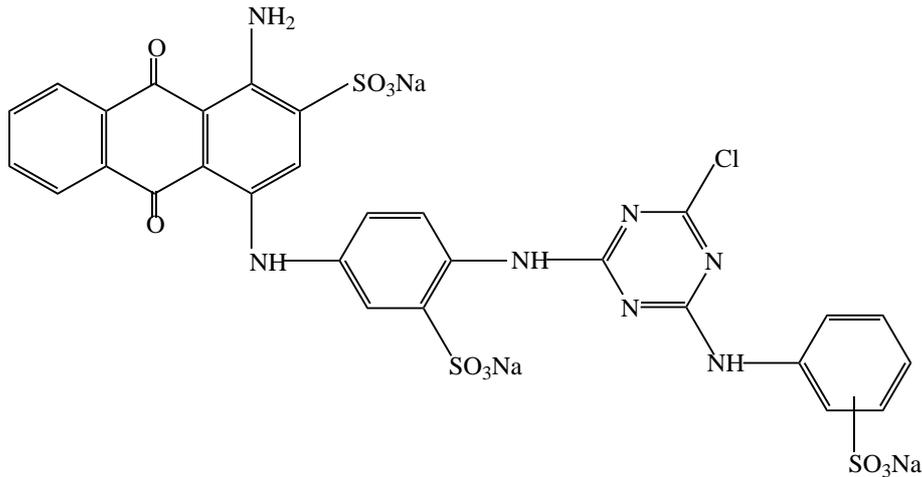


Abbildung 10: Cibacron Blue bzw. Basilin Blue 3 EG [POUCHERT 1985]

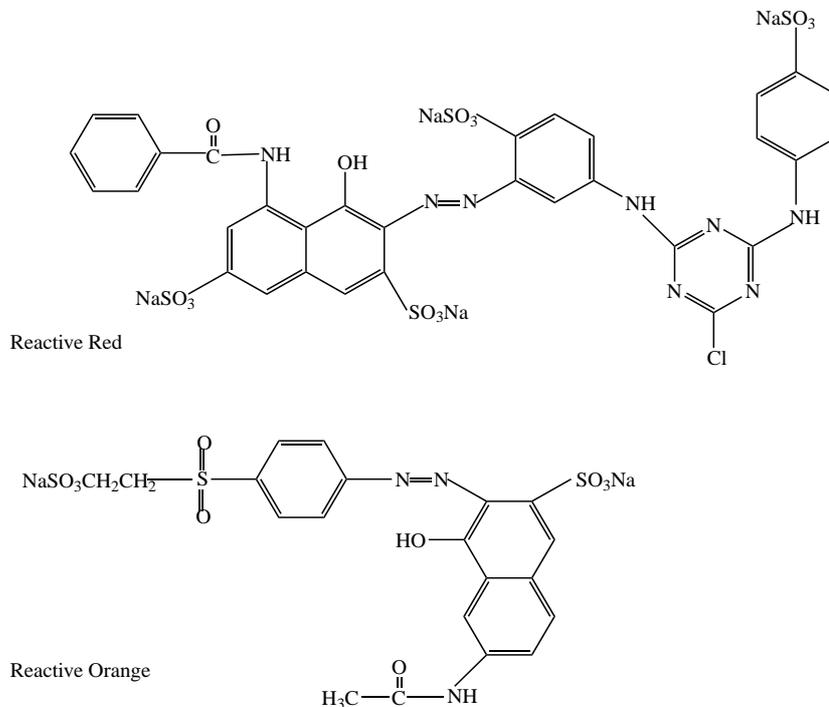


Abbildung 11: Strukturformeln der Reaktivfarbstoffe Reaktivorange und Reaktivrot [POUCHERT 1985]

### 4.3.3 Enzymatische Substratmodifikation

50 ml einer 5%igen Haferspелzenxylanlösung in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 (s. Anhang) wurden mit 1 ml 50 IE/ml Enzympräparat Barlican® (*Trichoderma reesei* I) bzw. Lyxasan® (*Aspergillus niger* I) versetzt und 1 bis 24 h bei 20 und 40°C gerührt, in der Mikrowelle aufgekocht, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit dem doppelten Volumen von 96%igem Ethanol gefällt und abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde gefriergetrocknet und durch Mörsern homogenisiert. Der Versuch wurde mit dem Unterschied wiederholt, daß das hydrolysierte Xylan

kontinuierlich abgeführt wurde. Dazu wurden 50 ml einer 5%igen Xylanlösung (unbehandelt bzw. zuvor autoklaviert) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 mit 1 ml 240 IE/ml Enzympräparat Barlican® (*Trichoderma reesei*) bzw. 1 ml 160 IE/ml Lyxasan® (*Aspergillus niger*) versetzt und 0,5 h bzw. 24 h bei 40°C in einer Rührzelle (Amicon, Beverly, USA) durch einen 10-kD-Polysulfonfilter (Sartorius, Göttingen) unter Rühren kontinuierlich filtriert. Der 10-kD-Polysulfonfilter läßt alle Moleküle passieren, die <10 kD sind, also auch das Hydrolysat, hält jedoch das Enzym zurück, da es >10 kD ist. Während der Hydrolyse wurde die Rührzelle mit 20 mM Natriumacetatpuffer (bei pH 6,0) aufgefüllt. Das Hydrolysat des Haferspelzenxyllans, welches den Filter passierte, wurde gefriergetrocknet und homogenisiert.

#### 4.3.4 Substratcharakterisierung

Die verschiedenen modifizierten Haferspelzenxyllane müssen charakterisiert werden, um ihre Eigenschaften als Substrat zur Enzymaktivitätsbestimmung beurteilen zu können. Dazu wurde z.B. Löslichkeit, chemisch gebundenes Wasser, etc. bestimmt.

Um die Konzentration des in Natriumacetatpuffer gelösten Haferspelzenxyllans zu bestimmen, wurden 0,1–1 ml Xylanlösung in vorgewogene 10 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden 24 h bei 105°C getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsiccator wurde die Trockensubstanz (TS) bestimmt.

Mit dem DNSS-Test sollte untersucht werden, inwieweit sich die Modifikation von Haferspelzenxyllan auf die Anzahl der reduzierenden Gruppen im Vergleich gegenüber unbehandeltem Haferspelzenxyllan auswirkt. Als Referenzlösung diente die Reaktion von unbehandeltem Haferspelzenxyllan mit dem DNSS-Reagenz (s. 4.1.3 Enzymaktivität über die Bildung reduzierenden Zucker). Dazu wurden zu 200 µl 0,5%ige Haferspelzenxyllanderivatlösung 100 µl DNSS-Reagenz zugegeben, 5 min gekocht, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 1 ml Wasser verdünnt.

Untersuchungen zur Bestimmung des chemisch gebundenen Wassers im Vergleich zum freien Wasser wurden mittels NMR von Herrn Dipl.-Chem. Ingolf Sack (Institut für organische Chemie, Arbeitsgruppe Limbach, Freie Universität Berlin) durchgeführt. Die Quantität des chemisch gebundenen Wassers im Vergleich zum chemisch freien Wasser wurde mittels <sup>1</sup>H-Festkörper-NMR bestimmt. Dazu wurden die Proben mit 5 kHz um den magischen Winkel von 54,7° rotiert und die Spektren in einem 300 Mhz Spektrometer aufgenommen. Die Detektion erfolgte nach einem einzelnen 90°-Puls im Protonenkanal. Es wurden 160 Scans akkumuliert.

Die Hydrolyseprodukte verschiedener Haferspelzenxyylanmodifikationen wurden in der HPLC (Fa. DIONEX, Idstein), wie unter Bestimmung der Hydrolysemuster mittels HPLC (4.1.9) bereits beschrieben, analysiert.

Kongorot gibt mit unbehandeltem Haferspelzenxyylan ohne Zugabe von Isopropanol einen Niederschlag (s. Vorschrift ionische Farbstoffe). Hydrolysiertes Haferspelzenxyylan wird durch Kongorot nicht angefärbt (s. Agardiffusionstest). Diese Reaktion sollte zur Unterscheidung der verschiedenen Xylanderivate ausgenutzt werden. 1 g Haferspelzenxyylan (unbehandelt o. modifiziert) wurde in 100 ml 0,2 M Carbonatpuffer pH 10,0 gelöst mit 0,1 g Kongorot versetzt, 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt und geprüft, ob ein Niederschlag ausgefällt wurde.

Weiterhin wurde versucht, die Molmassen von modifizierten und anschließend acetylierten, bzw. benzoilierten Haferspelzenxyylanen in der Gelpermeationschromatographie (GPC) zu bestimmen.

Die Absorptionsmaximae der verschiedenen chromogenen Substrate (s. Tab. 47) wurden mit dem Spektrometer (Ultraspec 2000, Pharmacia) mittels des Programms Wavescan (Pharmacia, Schweden) über einen Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm ermittelt.

Die Viskosität und Löslichkeit von Haferspelzenxyylan in Natriumacetatpuffer wurde in Abhängigkeit von der Dauer der Ultraschallbehandlung untersucht, um den optimalen Punkt zu finden, an dem sich möglichst viel Substrat löst und die Viskosität der Lösung genügend hoch zur Enzymaktivitätsbestimmung ist. Eine 5%ige Haferspelzenxyylansuspension wurde in Einzelgefäßen verschiedene Zeiträume der Ultraschallbehandlung (s. 4.3.1 physikalische Substratmodifikation) unterworfen. Dann wurde die Viskosität und die Konzentration (TS) der Haferspelzenxyylanlösung bestimmt.

#### **4.3.5 Futtermittel**

Tabelle 3 zeigt die Hauptkomponenten der in dieser Arbeit untersuchten Futtermittel. Futtermittel B besteht überwiegend aus Gerste, enthält also mehr  $\beta$ -Glucane als Pentosane. Futtermittel W (Weizen), G (Mais) und R (Roggen) enthalten mehr Pentosane als  $\beta$ -Glucane.

Futtermittel A besteht zu ungefähr gleichen Anteilen aus Gerste und Weizen, der  $\beta$ -Glucan- und Pentosananteil ist ungefähr gleich (Die Abschätzungen beruhen auf Tab. 1 [JEROCH 1998]).

Tabelle 3: Hauptbestandteile<sup>1</sup> der Futtermittel

Futtermittel	B (Gerste) [%]	W (Weizen) [%]	R (Roggen) [%]	T (Triticale) [%]	A (Ferkel- aufzucht) [%]	G (Geflügel- mast) [%]
Mais	–	–	–	–	–	30,0
Gerste	7,0	–	–	–	30,0	–
Weizen	–	64	–	–	36,0	30,0
Roggen	–	–	57	–	–	–
Triticale	–	–	–	62	–	–
Sojaboh- nenprotein	15,5	16,6	10	10	–	–
Sojaextrak- tionsschrot	–	–	–	–	27,0	28,0
Sojaöl	–	–	–	–	2,5	4,7
Tierisches Fett	7	7,0	–	–	–	–
Cellulose	–	5,8	5	5	–	–
*Mineral- mischung	1	1,0	1	1	k.a.	k.a.

\*Mineralstoff-Vitamin-Vormischung: Inhalt per kg: 1200000 IE Vit. A, 120000 IE Vit. D<sub>3</sub>, 4000 mg Vit. E, 200 mg Vit. B<sub>1</sub>, 600 mg Vit. B<sub>2</sub>, 2500 mg Niacin, 400 mg Vit. B<sub>6</sub>, 4000  $\mu$ g Vit. B<sub>12</sub>, 20000  $\mu$ g Biotin, 1800 mg Pantothenic acid, 50000 mg Cholinchloride, 75000 mg Fe, 7500 mg Mn, 10000 mg Zn, 70 mg Co, 150 mg J, 10000 mg Metichlorpindol, 835 mg Methylbenzoat, 160 g Na, 50 g Mg;

<sup>1</sup>übrige Bestandteile: Kalk u. Aminosäuren, k.a. = keine Angabe

Die Absorptionsspektrum der Futtermittlextrakte A und G (s. Extraktion) wurde wie die der Farbstoffe mit dem Spektrometer Ultraspec 2000 mittels des Programms Wavescan über einen Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm ermittelt.

0,5%iger Futtermittel A-Extrakt wurde nach Konzentrationsbestimmung mittels der Trockensubstanzmethode in gleicher Konzentration als Substrat im Agardiffusionstest (0,5 mg/ml) auf die gleiche Weise eingesetzt wie z.B. Haferspelzenxyilan.

Hydrolyseprodukte chromogener Substraten mit gekoppelten Reaktivfarbstoffen bzw. freie Reaktivfarbstoffe reagieren mit Komponenten aus der Mischung Futtermittlextrakt/Enzymlösung. Um zu entscheiden, ob die Reaktion mit dem Protein des Enzympräparates oder mit Po-

lysaccharid aus dem Futtermittel stattfindet, wurde die Enzymkomponente durch Protein simuliert. Dazu wurden 500 µl 0,1–0,5%ige Rinderserumalbuminlösung (bzw. 0,1–0,5%iger Futtermittlextrakt) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 mit 500 µl 1 bzw. 0,1%iger RBB-Lösung vermischt und 5–60 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde abzentrifugiert und gegen eine entsprechende Referenzlösung ohne Rinderserumalbumin gemessen.

Wenn freier Reaktivfarbstoff bzw. Hydrolyseprodukte mit gekoppelten Reaktivfarbstoffen mit Polysacchariden aus dem Futtermittlextrakt reagieren, so sollte ein Überschuß von freiem Reaktivfarbstoff die reaktiven Gruppen der Polysaccharide absättigen, so daß der enzymatisch freigesetzte Farbstoff bzw. Hydrolyseprodukte mit Reaktivfarbstoff nicht mehr mit Polysacchariden aus dem Futtermittel reagiert. Die freigesetzten Hydrolyseprodukte mit Reaktivfarbstoff sollten dann nach der Ethanol-fällung und anschließender Zentrifugation im Überstand photometrisch meßbar bleiben.

Um diese Möglichkeit der „Maskierung“ reaktiver Gruppen für die Enzymaktivitätsbestimmung im komplexen Medium auszutesten wurden 20 mg/ml chromogenes Substrat in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 mit 0,1% RBB gelöst bzw. suspendiert, und die Lösung wurde auf 50°C vortemperiert, 275 µl Enzymlösung wurden in einem Reaktionsgefäß mit 250 µl chromogener Substratlösung mit freiem RBB vermischt und 1 h im Wasserbad bei 50°C inkubiert. Dann wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 ml Ethanol gestoppt. Die Mischung wurde 10 min bei 9000×g zentrifugiert und 15 min bei Raumtemperatur zur Gleichgewichtseinstellung stehen gelassen. Der Überstand wurde in eine Küvette pipettiert und die Extinktion in einem auf 50°C temperierten Probenkarussell gegen eine gleichbehandelte Blindprobe bestimmt. Die Blindprobe bestand aus 250 µl chromogener Substratlösung mit freiem RBB, 275 µl 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 und 1 ml Ethanol.

Futtermittlextrakt enthält Polysaccharide [JEROCH 1998]. Die enzymatische Hydrolyse dieser futtermittleigenen Polysaccharide soll zur Enzymaktivitätsbestimmung ausgenutzt werden, indem die Hydrolyseendprodukte mit Reaktivfarbstoffen umgesetzt werden. 250 µl Futtermittlextrakt und 25 µl Enzymlösung in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 wurden mit 250 µl 0,1%iger Reaktivfarbstofflösung vermischt und 1 h auf einem Wasserbad bei 40°C inkubiert, die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 ml Ethanol gestoppt, die Mischung für 10 min bei 9000 ×g zentrifugiert und für 15 min bei Raumtemperatur zur Gleichgewichtseinstellung zwischen gelösten und ungelösten Farbstoff stehen gelassen. Der Überstand wurde in eine Küvette pipettiert und die Absorption des freien Farbstoffs in einem auf 50°C temperierten Probenkarussell gegen einen gleichbehandelten Blindwert bestimmt. Der Blindwert bestand aus 250 µl chro-

mogener Substratlösung, 250 µl Futtermittlextrakt und 25 µl 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 und 1 ml Ethanol.

#### 4.4 Enzymbestimmung durch Farbreaktion

Methodenentwicklung: 10 ml 0,5%ige Ultraschallxylanlösung (s. Substratmodifikation) wurde mit 1 ml 100 IE/ml Enzympräparat Lyxasan® unter Rühren für 48 h bei 40°C hydrolysiert. 400 µl 0,5%ige enzymatisch hydrolysierte Ultraschallxylanlösung wurde entnommen und mit 100 µl 0,5%iger Farbstofflösung (z.B. Reaktivgrün, Abb. 12)

1. 30 min bei 40°C inkubiert,
2. 30 min bei 40°C inkubiert und 5 min gekocht,
3. 30 min bei 40° inkubiert mit 50 ml 4 N NaOH zur Deprotonierung des Farbstoffs alkalisiert und 5 min gekocht.

Anschließend wurden die Proben im Eisbad auf Raumtemperatur abkühlt, 1 ml Ethanol zugefügt, 15 min zur Gleichgewichtseinstellung stehen lassen, zentrifugiert, in Küvetten umgefüllt und sofort gemessen. Die Blindprobe bestand aus 100 µl Farbstofflösung und 400 µl Puffer, sie wurde genau wie die Proben behandelt. Die Versuche wurden ohne Gleichgewichtseinstellung und mit verschiedenen Reaktivgrünkonzentrationen (0,5, 1, 2, 3%, vgl. Abb. 12) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 und hydrolysiertem Ultraschallxylan wiederholt.

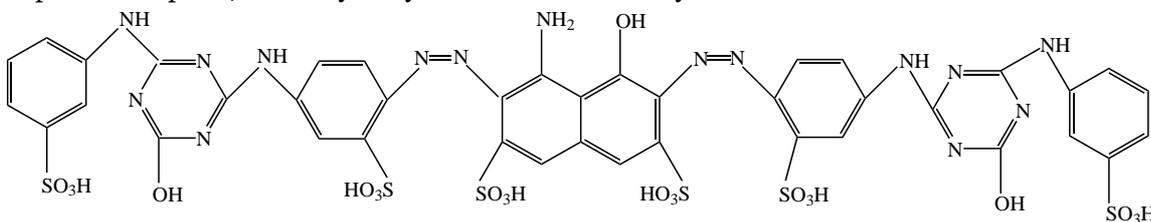


Abbildung 12: Strukturformel Reaktivgrün 19 [POUCHERT 1985]

Die Enzymaktivitätsbestimmungen wurden mit 0,05, 0,5, 0,1 und 1%igen Farbstofflösungen und mit den Enzympräparaten Biofeed plus®, Biofeed Wheat®, Biopract®, Roxazyme®, Avizyme®, Energex®, Hostazym X® als Langzeithydrolyseversuche wiederholt. Dazu wurden 20 ml 0,5%iges Ultraschallxylan (UX) in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 mit 1 ml 5 IE/ml der jeweiligen Enzymlösung 100 bis 120 h gerührt. Als Blindprobe wurden 20 ml 0,5%iges UX in Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 und 1 ml Natriumacetatpuffer bei pH 6,0 ebenfalls 100 bis 120 h gerührt. Es wurden jeweils 400 µl Lösung entnommen und mit 100 µl 0,1, 0,5 und 1%iger Farbstofflösung (Reaktivgrün, Calcufluor, Azurin B, Azurin A, Reaktivorange) und 50 µl 4 N NaOH 5 min gekocht, abgekühlt, mit 1 ml Ethanol gefällt, zentrifugiert und die Extinktion des farbigen Überstands gegen die Blindprobe photometrisch bestimmt.