

Aus dem Institut für Tierernährung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

***In-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen zur Effizienz  
verschiedener mikrobieller Phytasen als Futterzusatzstoff**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
PAULA BRÜNIG  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3349

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ortwin Simon  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rainer Borriss  
Dritter Prüfer: Prof. Dr. Karl Heinz Lahrmann

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

feed additives, enzymes, phytase, in vitro, properties, piglets, efficacy

Tag der Promotion: 25.01.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-782-4

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*Für meine Mutter*



**Inhalt**

Inhalt .....	I
Abbildungen .....	V
Tabellen .....	VIII
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Phosphor .....	3
2.1.1 Bedeutung für den Organismus .....	3
2.1.2 Bedarf .....	3
2.1.3 Regulationsmechanismen der Phosphathomöostase.....	4
2.1.4 Ausscheidung .....	4
2.1.5 Bestimmung der Phosphorverdaulichkeit .....	5
2.1.6 Auswirkungen auf die Umwelt.....	5
2.2 Vorkommen, Struktur und Eigenschaften von Phytinsäure und Phytat.....	5
2.2.1 Struktur und Nomenklatur .....	5
2.2.2 Vorkommen und Funktion in Pflanzen.....	7
2.2.3 Chemische und biochemische Eigenschaften von Phytat .....	8
2.2.4 Verdaulichkeit von Phytat im Darm von Nutztieren.....	12
2.3 Phytasen.....	12
2.3.1 Allgemeine Beschreibung .....	12
2.3.2 Pflanzliche Phytasen.....	14
2.3.3 Pilzliche Phytasen.....	19
2.3.3.1 <i>Aspergillus</i> -Phytase .....	19
2.3.3.2 <i>Peniophora</i> -Phytase.....	21
2.3.3.3 <i>Penicillium</i> -Phytase.....	23
2.3.4 Bakterielle Phytasen .....	23
2.3.4.1 <i>Klebsiella</i> -Phytase.....	23
2.3.4.2 <i>E.coli</i> -Phytase .....	25
2.3.4.3 <i>Bacillus</i> -Phytase .....	26
2.3.4.4 <i>Lactobacillus</i> -Phytase .....	30
2.3.5 Gentechnisch modifizierte Phytasen .....	31
2.3.5.1 <i>Consensus</i> -Phytase .....	31
2.3.5.2 <i>E.coli</i> -Phytase Phy9X.....	32
2.4 Schlussfolgerungen aus der Literaturübersicht .....	33
2.5 Zielstellung der eigenen Untersuchungen .....	34
3 Material und Methoden .....	35
3.1 Reagenzien/Chemikalien .....	35
3.1.1 In die Untersuchungen einbezogene Enzympräparate .....	35
3.2 Geräte.....	36
3.3 Methoden.....	37
3.3.1 Bestimmung der Phytaseaktivität in Rohenzymen und Futtermitteln .....	37
3.3.1.1 Reagenzien.....	37
3.3.1.2 Standardlösung.....	38
3.3.1.3 Probenvorbereitung.....	38
3.3.1.3.1 Rohenzym .....	38
3.3.1.3.2 Futtermittel .....	38
3.3.1.4 Analyse der Phytaseaktivität .....	39
3.3.1.4.1 Standards und Proben.....	39
3.3.1.4.2 Standard- und Probenblindwerte .....	39
3.3.1.4.3 Berechnung der Phytaseaktivität .....	39
3.3.2 Bestimmung der Phytaseaktivität von Optiphos .....	39
3.3.2.1 Reagenzien.....	40
3.3.2.2 Standardlösung.....	41
3.3.2.3 Probenvorbereitung.....	41

3.3.2.4	Analyse der Phytaseaktivität .....	41
3.3.2.4.1	Proben und Probenblindwerte - Analyseschritt 1 .....	41
3.3.2.4.2	Proben, Standards und Standardblindwerte - Analyseschritt 2 .....	41
3.3.2.4.3	Berechnung der Phytaseaktivität .....	42
3.3.3	Bestimmung der Phytaseaktivität von FB-Phytase .....	42
3.3.3.1	Reagenzien.....	42
3.3.3.2	Standardlösung.....	43
3.3.3.3	Probenvorbereitung.....	43
3.3.3.4	Analyse der Phytaseaktivität .....	43
3.3.3.4.1	Standards und Proben.....	43
3.3.3.4.2	Standard- und Probenblindwerte .....	43
3.3.3.4.3	Berechnung der Phytaseaktivität .....	44
3.3.4	Charakterisierung der Phytasen.....	44
3.3.4.1	Bestimmung des pH-Optimums.....	44
3.3.4.1.1	Reagenzien .....	44
3.3.4.1.2	Standardlösung .....	45
3.3.4.1.3	Analyse des pH-Optimums - Standards und Proben.....	46
3.3.4.1.4	Analyse des pH-Optimums - Standard- und Probenblindwerte .....	46
3.3.4.1.5	Berechnung der Phytaseaktivität .....	46
3.3.4.2	Bestimmung des Temperatur-Optimums.....	47
3.3.4.2.1	Reagenzien .....	47
3.3.4.3	Bestimmung der Temperatur-Stabilität in Pufferlösung .....	47
3.3.4.3.1	Reagenzien .....	47
3.3.4.3.2	Analyse der Temperatur-Stabilität - Schritt 1.....	47
3.3.4.3.3	Standards und Proben - Schritt 2.....	47
3.3.4.3.4	Standard- und Probenblindwerte - Schritt 2 .....	48
3.3.4.3.5	Berechnung der Phytaseaktivität .....	48
3.3.4.4	Bestimmung der Temperaturstabilität beim Pelletiervorgang.....	48
3.3.4.4.1	Vorbereitung der Diäten.....	48
3.3.4.4.2	Pelletierung .....	49
3.3.4.4.3	Bestimmung der Restphytaseaktivität nach dem Pelletiervorgang .....	49
3.3.4.5	Bestimmung der Pepsinstabilität .....	49
3.3.4.5.1	Reagenzien .....	49
3.3.4.5.2	Analyse der Proben – Schritt 1 .....	49
3.3.4.5.3	Analyse der Standards und Proben - Schritt 2 .....	50
3.3.4.5.4	Standard- und Probenblindwerte .....	50
3.3.4.5.5	Berechnung der Phytaseaktivität .....	50
3.3.4.6	Bestimmung der Pankreatinstabilität .....	51
3.3.4.6.1	Reagenzien .....	51
3.3.4.6.2	Analyse der Proben – Schritt 1 .....	51
3.3.4.6.3	Analyse der Standards und Proben – Schritt 2 .....	51
3.3.4.6.4	Standard- und Probenblindwerte .....	51
3.3.4.6.5	Berechnung der Phytaseaktivität .....	52
3.3.4.7	Effekt von Digestaüberstand aus Magen und Jejunum auf die Phytaseaktivität.....	52
3.3.4.7.1	Herstellen der Digestaüberstandslösungen .....	52
3.3.4.7.2	Reagenzien .....	53
3.3.4.7.3	Probenanalyse – Schritt 1.....	53
3.3.4.7.4	Standards und Proben - Schritt 2.....	53
3.3.4.7.5	Standard- und Probenblindwerte .....	53
3.3.4.7.6	Berechnung der Phytaseaktivität .....	54
3.3.5	Bestimmung des Gesamtphosphorgehalts in Futtermittelproben oder Kotproben .....	54
3.3.5.1	Reagenzien.....	54
3.3.5.2	Probelösung.....	54
3.3.5.3	Ansätze für die Messung.....	55

3.3.5.3.1	Leerwert .....	55
3.3.5.3.2	Verdünnungsreihe aus der Eichlösung .....	55
3.3.5.3.3	Messlösung .....	55
3.3.5.4	Messung der Absorption .....	55
3.3.5.5	Berechnung des Gesamtphosphorgehalts .....	55
3.3.6	Analyse der Inositolphosphate aus dem enzymatischen Abbau durch Phytasen.....	55
3.3.6.1	Bestimmung der Produkte aus dem enzymatischen Abbau einer einzelnen Phytase.....	56
3.3.6.1.1	Reagenzien .....	56
3.3.6.1.2	Analyse.....	57
3.3.6.2	Bestimmung der Produkte aus dem sequentiellen Abbau einer <i>E.coli</i> -Phytase und einer <i>Bacillus</i> -Phytase .....	57
3.3.6.2.1	Reagenzien .....	57
3.3.6.2.2	Nullproben .....	58
3.3.6.2.3	Probenvorbereitung .....	58
3.3.6.2.4	Inositolphosphatanalyse .....	58
3.3.7	Effizienz von Optiphos auf Gesundheit, Leistung und P- und Ca-Verdaulichkeit bei Absetzferkeln .....	59
3.3.7.1	Versuchsprinzip und -ziel .....	59
3.3.7.2	Tiere und Unterbringung der Tiere .....	59
3.3.7.3	Versuchsplan .....	59
3.3.7.4	Diäten .....	60
3.3.7.5	Parameter .....	61
3.3.7.5.1	Leistung.....	61
3.3.7.5.2	Gesundheitsstatus und Konsistenz der Fäzes .....	62
3.3.7.5.3	Scheinbare Ca- und P-Verdaulichkeit .....	62
3.3.7.6	Analysen .....	62
3.3.7.7	Statistik .....	62
4	Ergebnisse .....	63
4.1	Aktivitätsbestimmung der Phytase-Rohwaren nach der AOAC-Methode .....	63
4.2	Aktivitätsbestimmung der Optiphos-Rohware nach der United Feeds-Methode ....	63
4.3	Aktivitätsbestimmung der FB-Phytase-Rohware nach der FB-Molybdat-Blau-Methode .....	63
4.4	Charakterisierung der Phytasen.....	64
4.4.1	pH-Verhalten.....	64
4.5	Temperaturverhalten.....	65
4.5.1	Temperaturoptimum.....	65
4.5.2	Temperaturstabilität in wässriger Lösung.....	66
4.5.3	Temperaturstabilität beim Pelletiervorgang .....	67
4.6	Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen.....	68
4.6.1	Stabilität gegenüber Pepsin und Pankreatin.....	68
4.6.2	Effekt von Digestaüberstand auf die Phytaseaktivität.....	69
4.6.3	Produkte aus dem enzymatischen Abbau einer einzelnen Phytase .....	70
4.6.3.1	<i>Aspergillus</i> -Phytase (Natuphos®) .....	71
4.6.3.2	<i>E.coli</i> -Phytase (Optiphos).....	75
4.6.3.3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -Phytase .....	80
4.6.4	Produkte aus dem sequentiellen Phytatabbau durch eine <i>E.coli</i> - und eine <i>Bacillus</i> -Phytase .....	84
4.6.4.1	Sequentieller Phytatabbau .....	84
4.6.5	<i>In-vivo</i> -Versuch: Effizienz der <i>E.coli</i> -Phytase Optiphos auf Gesundheit, Leistung und P- und Ca- Verdaulichkeit bei Absetzferkeln .....	89
4.6.5.1	Analyse der Diäten.....	89
4.6.5.2	Leistung .....	90
4.6.5.2.1	Gewichtszunahme .....	90
4.6.5.2.2	Futteraufnahme .....	92

# INHALT

---

4.6.5.2.3	Futteraufwand.....	92
4.6.5.3	Konsistenz der Fäzes.....	94
4.6.5.4	Scheinbare Verdaulichkeit.....	94
4.6.5.4.1	Scheinbare Phosphorverdaulichkeit.....	94
4.6.5.4.2	Scheinbare Calciumverdaulichkeit.....	101
4.6.5.4.3	Rohasche-Verdaulichkeit.....	103
5	Diskussion.....	106
5.1	Methoden zur Aktivitätsbestimmung in Phytase-Rohwaren.....	106
5.2	Biochemische Charakterisierung der Phytasen.....	107
5.2.1	pH-Verhalten.....	107
5.2.2	Temperaturverhalten.....	107
5.2.2.1	Temperaturoptimum.....	107
5.2.2.2	Temperaturstabilität in wässriger Lösung.....	107
5.2.2.3	Temperaturstabilität beim Pelletiervorgang.....	108
5.2.3	Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen.....	109
5.2.3.1	Stabilität gegenüber Pepsin und Pankreatin.....	109
5.2.3.2	Effekt von Digestaüberstand auf die Phytaseaktivität.....	110
5.3	Produkte aus dem enzymatischen Abbau einer einzelnen Phytase.....	110
5.3.1	<i>Aspergillus</i> -Phytase (Natuphos®).....	110
5.3.2	<i>E.coli</i> -Phytase (Optiphos).....	111
5.3.3	<i>Bacillus</i> -Phytase.....	112
5.4	Produkte aus dem sequentiellen Phytatabbau durch eine <i>E.coli</i> - und eine <i>Bacillus</i> -Phytase.....	113
5.5	<i>In-vivo</i> -Versuch: Effizienz einer <i>E.coli</i> - und einer <i>Aspergillus</i> -Phytase auf Gesundheit, Leistung und P- und Ca-Verdaulichkeit bei Absetzferkeln.....	114
5.5.1	Leistung.....	114
5.5.1.1	Gewichtszunahme.....	114
5.5.1.2	Futteraufnahme und Futteraufwand.....	115
5.5.1.3	Scheinbare P-, Ca- und Rohasche-Verdaulichkeit.....	115
5.6	Schlussfolgerungen.....	116
5.6.1	Schlussfolgerungen aus den <i>in-vitro</i> -Versuchen.....	116
5.6.2	Schlussfolgerungen aus den Versuchen zum enzymatischen Abbau einzelner Phytasen und dem sequentiellen Phytatabbau durch eine <i>E.coli</i> - und eine <i>Bacillus</i> -Phytase.....	117
5.6.3	Schlussfolgerungen aus dem <i>in-vivo</i> -Versuch mit Absetzferkeln.....	118
6	Zusammenfassung.....	119
7	Summary.....	122
8	Zitierte Literatur.....	125
	Anhang.....	135
	Danksagung.....	141
	Selbständigkeitserklärung.....	142



**Abbildungen**

Abbildung 1: Myo-Inositol(1,2,3,4,5,6)-Hexakis-Dihydrogenphosphat (C <sub>6</sub> H <sub>18</sub> P <sub>6</sub> O <sub>24</sub> ). Struktur der Phytinsäure bei neutralem pH basierend auf dem Anderson-Modell.....	6
Abbildung 2: Energetisch günstigste Konformation von Phytinsäure ( <i>myo</i> - Inositol- Hexakisphosphat). (Wyss et al., 1999) .....	6
Abbildung 3: D-und L-Zählung der C-Atome der Phytinsäure .....	7
Abbildung 4: Phytinsäure- Chelat bei neutralem pH (Erdman, 1979).....	8
Abbildung 5: Phytinsäure-Protein-Komplex bei niedrigem (A) und neutralem pH (B) (Anderson, 1985).....	10
Abbildung 6: Abbauwege der Leguminosen-Phytasen von <i>Lupinus albus</i> LP2 und <i>Vicia faba</i> und <i>Lupinus albus</i> LP11 und LP12 (Greiner et al., 2002b) .....	18
Abbildung 7: Abbauwege der Phytase von <i>Triticum aestivum</i> (Nakano et al., 2000).....	19
Abbildung 8: Abbauweg der <i>Aspergillus niger</i> -Phytase (3-Phytase) (Skoglund et al., 1997).21	
Abbildung 9: pH-Verhalten .....	64
Abbildung 10: Temperaturverhalten .....	65
Abbildung 11: Temperaturstabilität bei 50°C .....	66
Abbildung 12: Temperaturstabilität bei 60°C .....	67
Abbildung 13: Temperaturstabilität bei 70°C .....	67
Abbildung 14: IP6 in den Nullproben .....	70
Abbildung 15: Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (15 min) .....	71
Abbildung 16: Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (45 min) .....	73
Abbildung 17: Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (90 min) .....	73
Abbildung 18: Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (120 min) .....	74
Abbildung 19: Molares Verhältnis (Mol%) der Inositolphosphate während der Inkubation mit einer <i>Aspergillus</i> -Phytase .....	75
Abbildung 20: Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (15 min).....	76
Abbildung 21: Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (45 min).....	77
Abbildung 22: Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (90 min).....	78
Abbildung 23: Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (120 min).....	79

## ABBILDUNGEN

---

Abbildung 24: Molares Verhältnis (Mol%) der Inositolphosphate während der Inkubation mit einer <i>E.coli</i> -Phytase .....	80
Abbildung 25: Inositolphosphate nach Inkubation mit <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (15 min) ...	81
Abbildung 26: Inositolphosphate nach Inkubation mit <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (45 min) ...	82
Abbildung 27: Inositolphosphate nach Inkubation mit <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (90 min) ...	83
Abbildung 28: Inositolphosphate nach Inkubation mit <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (120 min) .	84
Abbildung 29: Inositolphosphate nach Inkubation mit der <i>E.coli</i> -Phytase (60 min) .....	85
Abbildung 30: Inositolphosphate nach Inkubation mit der <i>E.coli</i> -Phytase (60 min) und der <i>Bacillus</i> -Phytase (45 min) .....	87
Abbildung 31: Inositolphosphate nach Inkubation mit der <i>E.coli</i> -Phytase (60 min) und der <i>Bacillus</i> -Phytase (90 min) .....	88
Abbildung 32: Produkte aus dem sequentiellen Phytatabbau durch eine <i>E.coli</i> - und eine <i>Bacillus</i> -Phytase .....	88
Abbildung 33: Effekt von Optiphos auf die Gewichtszunahme (24. bis 65. Lebenstag).....	91
Abbildung 34: Effekt von Natuphos® auf die Gewichtszunahme (24. bis 65. Lebenstag) .....	92
Abbildung 35: Effekt von Optiphos auf den Futteraufwand (kg Futter pro kg Gewichtszunahme), (24. bis 65. Lebenstag).....	93
Abbildung 36: Effekt von Natuphos® auf den Futteraufwand (kg Futter pro kg Gewichtszunahme), (24. bis 65. Lebenstag).....	93
Abbildung 37: Effekt von Optiphos auf die P-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag) .....	97
Abbildung 38: Effekt von Natuphos® auf die P-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag).....	97
Abbildung 39: Effekt von Optiphos auf die P-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebenstag) .....	98
Abbildung 40: Effekt von Natuphos® auf die P-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebenstag).....	98
Abbildung 41: Wirksamkeit zweier Phytasen auf die P-Verdaulichkeit bei Ferkeln (40. bis 45. Lebenstag).....	99
Abbildung 42: Effekt von Optiphos auf die Ca-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag).....	101
Abbildung 43: Effekt von Natuphos® auf die Ca-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag) ....	102
Abbildung 44: Effekt von Optiphos auf die Ca-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebenstag) .....	102
Abbildung 45: Effekt von Natuphos® auf die Ca-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebenstag) ....	103
Abbildung 46: Effekt von Optiphos auf die Ra-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag) .....	104
Abbildung 47: Effekt von Natuphos® auf die Ra-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag) ....	104

## ABBILDUNGEN

---

Abbildung 48: Effekt von Optiphos auf die Ra-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebensstag) .....	105
Abbildung 49: Effekt von Natuphos® auf die Ra-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebensstag) ....	105
Abbildung 50: Abbauweg von Natuphos® .....	111
Abbildung 51: Abbauweg von Optiphos .....	112
Abbildung 52: Abbauweg von Bacillus amyloliquefaciens .....	112

**Tabellen**

Tabelle 1: Phytaseaktivität in Futtermitteln (Eeckhout und De Paepe, 1994).....	15
Tabelle 2: Pflanzliche Phytasen und ihre Eigenschaften .....	17
Tabelle 3: Reagenzien/Chemikalien .....	35
Tabelle 4: Geräte .....	36
Tabelle 5: Zusammensetzung der Basaldiät.....	48
Tabelle 6: Zusammensetzung der Schweinediät .....	52
Tabelle 7: Versuchplan.....	59
Tabelle 8: Bestandteile der Basaldiät .....	61
Tabelle 9: Nährstoffe in der Basaldiät.....	61
Tabelle 10: Aktivität der Phytase-Rohwaren bestimmt nach der AOAC-Methode .....	63
Tabelle 11: Aktivität der Optiphos-Rohware bestimmt nach der United Feeds-Methode.....	63
Tabelle 12: Aktivität der FB-Phytase-Rohware bestimmt nach der FB-Molybdat-Blau- Methode .....	64
Tabelle 13: pH-Optima .....	64
Tabelle 14: Temperaturoptima .....	65
Tabelle 15 Ergebnisse der Temperaturstabilität beim Pelletiervorgang .....	68
Tabelle 16: Restaktivität (%) der Phytasepräparate nach 20 min. Inkubation bei 40°C in wässriger Pepsin- bzw. Pankreatinlösung .....	69
Tabelle 17: In der Digesta gemessene pH-Werte .....	69
Tabelle 18: Restaktivität (%) der Phytasepräparate nach 60 min. Inkubation bei 40°C in wässriger Digestaüberstandslösung* aus Magen und proximalem Jejunum.....	69
Tabelle 19: Peak-Analyse Inositolphosphate in den Nullproben .....	71
Tabelle 20: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (15 min).....	72
Tabelle 21: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (45 min).....	72
Tabelle 22: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (90 min).....	72
Tabelle 23: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (120 min).....	74
Tabelle 24: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (15 min) .....	75

## TABELLEN

---

Tabelle 25: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (45 min) .....	76
Tabelle 26: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (90 min) .....	77
Tabelle 27: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (120 min) .....	78
Tabelle 28: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (15 min) .....	80
Tabelle 29: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (45 min) .....	81
Tabelle 30: Tabelle: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (90 min) .....	82
Tabelle 31: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (120 min) .....	83
Tabelle 32: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit der <i>E.coli</i> -Phytase (60 min) .....	85
Tabelle 33: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit der <i>E.coli</i> -Phytase (60 min) und der <i>Bacillus</i> -Phytase (45 min) .....	86
Tabelle 34: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit der <i>E.coli</i> -Phytase (60 min) und der <i>Bacillus</i> -Phytase (90 min) .....	86
Tabelle 35: Analyseergebnisse der Diäten .....	89
Tabelle 36: Phytaseaktivitäten der Diäten (Durchschnittswerte) .....	89
Tabelle 37: Exemplarische Standardberechnung für das Mischen der Diäten je Gruppe zwecks Einhaltung der beabsichtigten Phytaseaktivitäten in 1000 g Futter .....	90
Tabelle 38: Periodisch zusammengefasste Leistungsparameter früh abgesetzter Ferkel während der sechswöchigen Versuchsperiode vom 24. bis zum 65. Lebenstag (Werte je Ferkel) .....	95
Tabelle 39: P- Ca- und Ra-Verdaulichkeit früh abgesetzter Ferkel vom 40. bis 45. und 60. bis 65. Lebenstag (Werte je Ferkel) .....	96
Tabelle 40: Phosphorfreisetzung aus Phytat und daraus errechnete Monocalciumphosphat (MCP)-Äquivalente .....	100
Tabelle 41: Mikrobielle Phytasen und ihre Eigenschaften .....	135



## 1 Einleitung

Getreide, Leguminosen, Ölsamen und deren Nebenprodukte sind die hauptsächlich eingesetzten Futterkomponenten für die Rationen monogastrischer Nutztiere. Diese Futterkomponenten stellen den von den Tieren benötigten Phosphor in ausreichender Menge zur Verfügung. Allerdings ist die Verfügbarkeit dieses Elementes gering, da etwa 60-80% des Phosphors in Form von Phytat gebunden vorliegt (Elkhalil et al., 2007) und in dieser Form gebundener Phosphor aufgrund fehlender intestinaler Phytasen für Nichtwiederkäuer kaum verfügbar ist (Williams und Taylor, 1985).

Nur etwa 10-15% des Phosphors in Getreide und 25% des Phosphors in Sojabohnen ist für Schweine verfügbar (Cromwell et al., 1995). Produzenten müssen deshalb anorganische Phosphate supplementieren, um den Phosphorbedarf zu decken (Yanke et al., 1998). Durch hohe Mengen an nicht abgebautem, wieder ausgeschiedenem Phytat entstehen besonders in der Umgebung von Intensivtierhaltungen mit Schweinen und Geflügel ernste Umweltbelastungen (Volfova et al., 1994).

Die Verwendung mikrobieller Phytasen als Futterzusatzstoff hat sich als eine mögliche Lösung dieses Problems herausgestellt. Die Zufuhr von anorganischen Phosphorverbindungen zur Ration kann unter diesen Bedingungen ganz oder teilweise entfallen, wenn anstelle dessen mikrobielle Phytasen supplementiert werden (Simon und Flachowsky, 2006).

Phytinsäure besitzt einen antinutritiven Effekt durch Bindung multivalenter Kationen wie Zink, Calcium und Eisen (Pallauf und Rimbach, 1997). Dies ist zurückzuführen auf die negative Ladung der sechs Phosphatgruppen des Phytats, die bei schwach saurem bis neutralem pH verschiedene bi- und trivalente Kationen (z.B. Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn) in einen stabilen Komplex binden können. Dadurch reduziert sich die Bioverfügbarkeit dieser Kationen (Al-Ashah und Duvnjak, 1995).

Phytasen kommen in der Natur in Pilzen (Tseng et al., 2000; Lassen et al., 2001), Hefen (Wodzinski und Ullah, 1996), Bakterien (Greiner et al., 1993; Greiner et al., 1997; Kerovuo et al., 1998; Kim et al., 1998) und Pflanzen (Reddy et al., 1982) vor. Sogar in tierischem Gewebe wurden geringe Phytaseaktivitäten nachgewiesen (Cooper und Gowing, 1983).

Phytasen (*myo*-Inositol-Hexakisphosphohydrolase, E.C. 3.1.3.8 oder E.C. 3.1.3.26) werden als Futterzusatzstoff eingesetzt. Zusätze von mikrobieller Phytase zum Futter können die Verdaulichkeit des Phosphors deutlich erhöhen (Pallauf und Rimbach, 1997)

Seitdem mikrobielle Phytasen fermentativ gewonnen werden und als Futterzusatzstoffe zur Verfügung stehen, lässt sich eine Steigerung der Phosphorverdaulichkeit in phytinreichen Futtermischungen mit geringer Aktivität nativer Phytase erzielen (Rodehutscord, 2001).

Die meisten Phytasen haben ein Temperaturoptimum im Bereich von 50-60°C. Die Körpertemperaturen der Nutztiere liegen jedoch mit Werten zwischen 38°C bis 39°C (Schwein) und 40°C bis 42°C (Huhn) weit unterhalb dieses Optimums. Dies ist einer der Gründe, weshalb die tatsächliche Verdaulichkeit des Phosphors trotz routinemäßig supplementierter Phytasen (mit etwa 500 FTU/kg Futter) nur bei etwa 65% liegt.

Weitere wichtige Faktoren für die gute Wirksamkeit einer supplementierten Phytase sind das pH-Verhalten und die proteolytische Stabilität. Im Magen der Nutztiere herrscht ein saurer pH, im Dünndarm jedoch ein neutraler. Die Digesta und somit auch die supplementierte

Phytase durchlaufen beide Abschnitte des Verdauungstraktes nacheinander. Auch den proteolytischen Enzymen des Verdauungstraktes muss die Phytase standhalten, die mit der Nahrung aufgenommen wird.

Es ist allgemein üblich, Tierfutter für Mastgeflügel und Schweine in pelletierter Form zu verfüttern, da die Pelletierung zum einen die Futteraufnahme für das Tier erleichtert, und zum anderen die Handhabung des Futters verbessert. Darüber hinaus können dem Futter zugesetzte Inhaltsstoffe, wie z.B. Enzyme in der Futtermischung besser eingeschlossen werden. Mischfutter für Nutztiere werden bei hohen Temperaturen von 80°C und mehr pelletiert. Diese starke Erhitzung erfolgt während des für die Pelletierung erforderlichen Vorganges des Konditionierens, bei welchem das Futter mit Dampf versetzt und dadurch erhitzt und befeuchtet wird. Beim eigentlichen Pelletieren wird dann das Futter durch eine Matrize gepresst und so in Form eines Pellets gebracht. Ein Enzym, das als Futterzusatzstoff verwendet wird, sollte aus diesem Grund eine hohe Temperaturstabilität aufweisen, um beim Pelletiervorgang nicht durch die Hitze inaktiviert zu werden.

Ziel dieser Dissertation ist es, einen Überblick zum Kenntnisstand über die biochemischen Eigenschaften und die Phytatabbauwege einiger pflanzlicher, pilzlicher und bakterieller Phytasen aufzuzeigen.

In eigenen Untersuchungen soll die Effizienz zweier *E.coli*-Phytasen mittels *in-vivo*-Studien und *in-vitro*-Studien zur biochemischen Charakterisierung untersucht werden. Da bisher vorwiegend pilzliche Phytasen als Futterzusatzstoff verwendet werden, soll auf dieser Grundlage eine vergleichende Einschätzung der Wirksamkeit von *E.coli*-Phytasen vorgenommen werden.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Phosphor

#### 2.1.1 Bedeutung für den Organismus

Phosphor ist das sechsthäufigste Element im Körper und in nahezu jeden Schritt des Metabolismus involviert (Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals Board on Agriculture and Natural Resources Division on Earth and Life Studies, 2005).

Es handelt sich bei Phosphor um ein essentielles Element, daher sollte die Phosphor-Versorgung von Tieren ausreichend sein. Eine Unterversorgung kann die Knochenmineralisierung reduzieren, die Fruchtbarkeit von Zuchtvieh vermindern sowie die tierische Leistung beeinträchtigen (Jongbloed und Kemme, 2002). Im Knochen liegen Phosphor und Calcium als strukturelle Komponenten von Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) vor (Jeroch et al., 1999). Das Verhältnis von Ca:P im Knochen liegt normalerweise bei 2:1. Im weichen Gewebe spielt Phosphor sowohl eine strukturelle als auch eine metabolische Rolle (Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals Board on Agriculture and Natural Resources Division on Earth and Life Studies, 2005). Phosphor hat im Körper eine Bedeutung als Komponente von energiereichen Phosphaten, wie z.B. in Adenosintriphosphat (ATP), als Bestandteil von Nucleinsäuren (DNA und RNA), Phospholipiden, Phosphokreatin, Puffersubstanzen in Blut und Zellflüssigkeit und als Vermittler von Hormonwirkungen (wie z.B. in cyklischem Adenosinmonophosphat, cAMP).

#### 2.1.2 Bedarf

Um den Erhaltungsbedarf an Phosphor angeben zu können, muss man den Bedarf für die Erhaltung der Körperfunktionen je nach Nutzungsrichtung und Leistungsstadium berücksichtigen, aber ebenso die unvermeidlichen endogenen Verluste an Phosphor, zu denen es durch die Ausscheidung mit dem Kot und Harn kommt.

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (DFG) hat in der Broschüre „Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler)“ verschiedene Veröffentlichungen herangezogen, um den Phosphorbedarf für oben genanntes Geflügel zu berechnen (GfE, 1999). Hier wird ein Erhaltungsbedarf für Phosphor von 0,083 g/kg Lebendmasse (W)/Tag(d) angegeben und folgendermaßen berechnet: Der Phosphorbedarf in g/kg W/d entspricht 1,5% des Phosphorgehaltes im Körper, wobei ein Phosphorgehalt im Körper von 5,5 g/kg Lebendmasse unterstellt wird. Bei Jeroch et al. (1999) ist angegeben, dass der Bedarf von Phosphor bei 0,25-0,5% und der von Calcium bei 0,5-0,7% in der Futterrockensubstanz liegt (Wiederkäuer, Schweine und Geflügel). Bei Legehennen besteht aufgrund der Eierschalenbildung mit 3-4% in der Futterrockensubstanz ein wesentlich höherer Calciumbedarf (Jeroch et al., 1999). Legehennen haben gegenüber dem wachsenden Küken und insbesondere im Vergleich zum Mastküken einen geringeren Bedarf an verfügbarem Phosphor (Tiller, 2000).

## 2.1.3 Regulationsmechanismen der Phosphathomöostase

Die Phosphat- Homöostase des nicht-ruminanten Organismus wird vornehmlich durch drei Organe bzw. Gewebe und drei Hormone aufrechterhalten, die zusammenwirkend Absorption, Exkretion und Einlagerung bzw. Resorption von Phosphaten im Körper regulieren, bei Aufrechterhaltung eines sich ständig wechselnden Pools an verschiedensten Phosphaten im Plasma (Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals Board on Agriculture and Natural Resources Division on Earth and Life Studies, 2005). Organe, die für die Phosphorregulation in erster Linie wichtig sind, sind der Darm, die Nieren und die Knochen, die an der Regulation hauptsächlich beteiligten Hormone sind das Parathormon (PTH), 1,25-Dihydroxycholecalciferol ( $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ) und Calcitonin (Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals Board on Agriculture and Natural Resources Division on Earth and Life Studies, 2005).

Phosphat wird vorwiegend im Dünndarm, aber auch in geringen Mengen im Magen und den Vormägen des Wiederkäuers durch aktiven Transport resorbiert (Jeroch et al., 1999). Je nach Verwertbarkeit der Phosphorquellen werden 20-80% resorbiert, wobei anorganischer Phosphor am besten verwertet wird (Jeroch et al., 1999). Förderlich für die Resorption von Phosphor aus dem Darm wirken Vitamin D, die Anwesenheit von Calciumionen, ein ausreichender Gehalt an Eiweiß im Futter, organische Säuren, Lactose und ein enges Ca:P-Verhältnis (Jeroch et al., 1999). Auf die Resorption wirken sich hingegen hemmend aus: ein weites Verhältnis von Calcium und Magnesium zu Phosphor im Verdauungstrakt, das Vorkommen von Phytat-Phosphor (bei Nichtwiederkäuern) sowie eine hohe Eisen- und Aluminiumzufuhr. Eisen und Aluminium bilden schwerlösliche Phosphatchelate (Jeroch et al., 1999). Phosphor wird aber nicht nur aktiv transportiert, sondern diffundiert ebenso passiv aus dem Darmlumen in das umliegende Gewebe. Dieser Vorgang findet vornehmlich im Jejunum und Ileum statt und ist direkt abhängig von der Phosphoraufnahme und dem Phosphorgehalt im Darmlumen (Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals Board on Agriculture and Natural Resources Division on Earth and Life Studies, 2005).

## 2.1.4 Ausscheidung

Man kann die Phosphorausscheidung in drei unterschiedliche Kategorien einteilen (Rodehutsord, 2001):

An erster Stelle sind physiologische Ausscheidungen zu nennen, die unabhängig von der Höhe der Phosphorversorgung auftreten und deren Beeinflussung nicht möglich ist. Die Phosphorausscheidung findet in erster Linie über den Verdauungstrakt statt. Als Folge der endogenen Sekretion von Phosphaten finden sich diese dann vorwiegend im Kot, aber auch im Harn wieder, wobei der Anteil der renalen Produkte geringer als 10% ist. Dieser Teil der Phosphorausscheidung wird als „unvermeidliche Verluste“ bezeichnet.

Als zweite Art der Phosphorausscheidung ist die Ausscheidung zur Aufrechterhaltung der Homöostase, also eine regulatorische Ausscheidung, zu nennen. Drittens ist für die Verdaulichkeit des Phosphors von entscheidender Bedeutung, in welcher Form der Phosphor gebunden ist. Da der überwiegende Teil des Phosphors in pflanzlichen Futtermitteln in Form von Phytat gebunden vorliegt, ist es Nichtwiederkäuern, bei denen das Enzym Phytase nicht gebildet wird, nicht möglich, das Phytat hydrolytisch zu spalten, um so

den Phosphor für die anschließende Absorption freizusetzen. Phytatreiche Futtermittel, die keine oder wenig pflanzeigene Phytase aufweisen, haben daher eine sehr geringe Phosphorverdaulichkeit.

## 2.1.5 Bestimmung der Phosphorverdaulichkeit

Bei der Bestimmung der Verdaulichkeit des Phosphors ist man an methodische Besonderheiten gebunden. Im Bereich einer marginalen Phosphorversorgung besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Phosphorresorption und -verdaulichkeit (Rodehutsord, 2001). Im Gegensatz dazu wird die Verdaulichkeit bei zunehmender Phosphorversorgung immer geringer. Um im Sinne der Futtermittelbewertung die Phosphorverdaulichkeit zu bestimmen, muss demnach dieser Effekt ausgeschaltet werden (Rodehutsord, 2001).

Es müssen bei Versuchen zur Verdaulichkeit des Phosphors Futterrationen an die Tiere verabreicht werden, bei denen der Phosphorgehalt unterhalb des Bedarfes liegt.

## 2.1.6 Auswirkungen auf die Umwelt

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Art der tierischen Erzeugung drastisch verändert. Es sind intensive Haltungssysteme für Nutztiere auf begrenzter Fläche entstanden (Jongbloed und Kemme, 2002).

Abgesehen von den Vorteilen, die sich daraus zweifelsohne ergeben, entstehen aber für die Umwelt Nachteile, die zum einen den Boden und zum anderen die Gewässer (Eutrophierung) betreffen:

Da der Anteil des in Phytinsäure enthaltenen Phosphors am Gesamt-Phosphor in den pflanzlichen Futtermitteln hoch ist, und dieser Phosphor kaum verdaulich ist, erfolgt traditionell eine Zugabe von Phosphor zum Mischfutter in Form von anorganischen Phosphorquellen wie z.B. Mono- oder Dicalciumphosphat. Dadurch kann der Bedarf der Tiere an diesem wichtigen Mineralstoff gedeckt werden (Kleist, 2002).

Der in der Phytinsäure gebundene Phosphor wird zum überwiegenden Teil unverdaut über Harn und Kot wieder ausgeschieden und kann in Gebieten bzw. auf Betrieben mit intensiver Tierproduktion zu starken Phosphoranreicherungen in Böden und Gewässern führen (über die Ausschwemmung und Erosion kommt es zur Eutrophie von Grund- und Binnengewässern).

Wenn man sich der Grenzen der globalen Rohphosphat-Ressourcen bewusst ist, muss man die Viehfütterung als ein Element des globalen Phosphatzyklus ansehen (Rodehutsord, 2008). Die Optimierung der Phosphorverwertung durch die Tiere ist nur eine Herausforderung. Eine weitere Aufgabe ist die richtige Balance zwischen dem Einsatz und der Ausscheidung von Phosphor, unter anderem weil in den Boden und das Grundwasser sickernder Phosphor umweltgefährdend ist (Rodehutsord, 2008).

## 2.2 Vorkommen, Struktur und Eigenschaften von Phytinsäure und Phytat

### 2.2.1 Struktur und Nomenklatur

Bei Phytinsäure handelt es sich um *myo*-Inositolhexaphosphat [ $C_6H_6 (OPO(OH)_2)_6$ ], den Hexaphosphorsäureester des zyklischen Alkohols *myo*-Inositol (Ingelmann et al., 1993).

Phytinsäure ist instabil und kommt vornehmlich als Natriumsalz vor (Cheryan, 1980) sowie als Salz von mono- und divalenten Kationen wie Kalium, Calcium und Magnesium (Deshpande und Cheryan, 1984). Die Salze der Phytinsäure werden als Phytate bezeichnet (Ingelmann et al., 1993).

Entsprechend der aktuellen Nomenklatur wird Phytat als *myo*-Inositol (1,2,3,4,5,6) Hexakis-Dihydrogenphosphat bezeichnet.

Phytat besitzt sechs Phosphatgruppen, die mit den Hydroxylgruppen des zyklischen Alkohols *myo*-Inositol verestert sind. Es ist mittlerweile generell anerkannt, dass die Struktur, die von Anderson (1914) vorgeschlagen wurde, zutreffend ist (Abbildung 1).

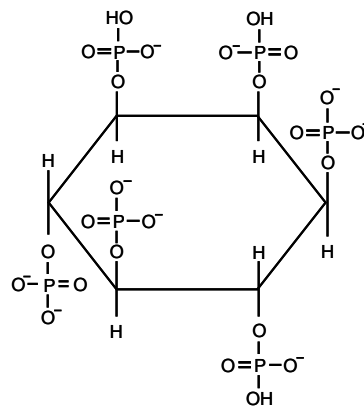


Abbildung 1: Myo-Inositol(1,2,3,4,5,6)-Hexakis-Dihydrogenphosphat ( $C_6H_{18}P_6O_{24}$ ). Struktur der Phytinsäure bei neutralem pH basierend auf dem Anderson-Modell

Unter den Verfechtern dieser von Anderson vorgeschlagenen Struktur gibt es aber noch immer die Meinungsverschiedenheit, ob sich die fünf Phosphatgruppen an den Kohlenstoffatomen  $C_1$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$  und  $C_6$  in axialer oder äquatorialer Lage befinden (Ingelmann et al., 1993). Wyss et al. (1999) sind beispielsweise der Meinung, dass sich in der energetisch günstigsten Konformation fünf der sechs Gruppen (Positionen 1, 3, 4, 5 und 6) in der äquatorialen Position befinden und nur die Phosphatgruppe an zweiter Position in axialer Anordnung zu finden ist (Abbildung 2).

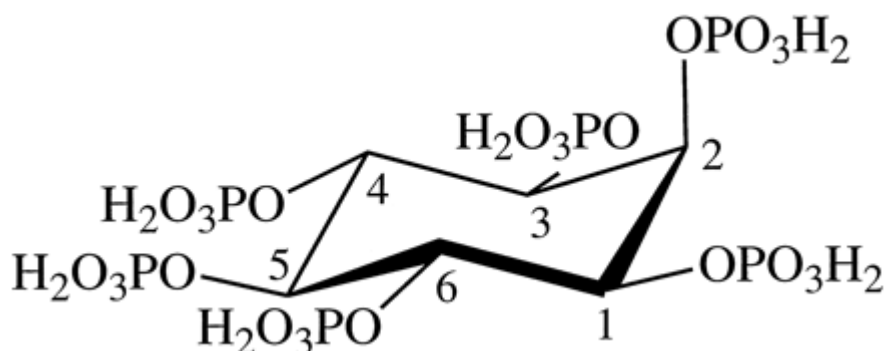


Abbildung 2: Energetisch günstigste Konformation von Phytinsäure (*myo*-Inositol-Hexakisphosphat). (Wyss et al., 1999)

Es gibt zwei verschiedene Zählweisen für die Nummerierung der C-Atome des Phytats: Bei der D-Zählung werden die C-Atome *im* Uhrzeigersinn vom ersten C-Atom aus durchgezählt. Bei der L-Zählung *entgegen* dem Uhrzeigersinn. Demnach entspricht das C6-Atom in der D-Zählung dem C4-Atom in der L-Zählung (Abbildung 3).

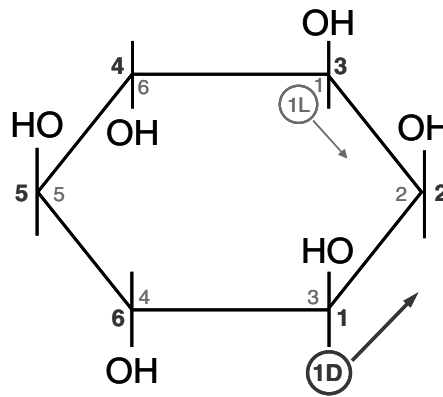


Abbildung 3: D- und L-Zählung der C-Atome der Phytinsäure

### 2.2.2 Vorkommen und Funktion in Pflanzen

Phytinsäure-Phosphor repräsentiert die Hauptphosphorreserve in Pflanzen und macht somit bis zu 85% des Gesamtphosphors in Getreide und Leguminosen aus (De Stefano et al., 2003).

In Getreide ist Phytat vornehmlich in der Aleuronschicht zu finden, in Mais vor allem im Keim. In Leguminosensamen akkumuliert die Phytinsäure in den Kotyledonen und in Leinsamen im Endosperm (Pallauf und Rimbach, 1997).

Phytat macht 1-3% von Getreide, Leguminosensamen und Nüssen aus und kommt auch in geringen Konzentrationen in Wurzeln, Knollen und Gemüse vor (Sandberg, 2002).

Die Aufgaben des Phytats in Pflanzen sind noch nicht vollständig bekannt. Eine wichtige Funktion scheint allerdings die des Phosphor- und *myo*-Inositol-Speichers zu sein (Asada et al., 1969; Deshpande und Cheryan, 1984; Laboure et al., 1993b). Des Weiteren hat Phytat die Funktion als Energielieferant: Biswas et al. (1978) isolierten und reinigten das Enzym *myo*-Inositol Hexaphosphat Adensindiphosphat Phosphotransferase aus ungekeimten Mungbohnsensamen. Dieses Enzym überträgt Phosphat von der C2-Position des *myo*-Inositolhexakisphosphat auf Adenosindiphosphat, um Adenosintriphosphat (ATP) zu synthetisieren. ATP stellt im Organismus die wichtigste Energiequelle des Stoffwechsels dar. Dvorakova (1998) nennt als Aufgaben von Phytinsäure in Pflanzen erstens die des Energiespeichers, zweitens den Konkurrenzkampf um ATP, drittens die Komplexierung multivalenter Kationen und viertens die Regulierung des Levels an anorganischem Phosphat.

Während der Reifungsperiode von Pflanzen findet ein aktiver Transport von Phosphor von den Blättern und Wurzeln in die Samen statt (Asada et al., 1969; Erdman und Poneros-Schneier, 1989). Phytat akkumuliert während der Reifung rasch in der Aleuronschicht der Samen (Asada et al., 1969; Deshpande und Cheryan, 1984). Phosphat und *myo*-Inositol

werden für die Keimung der Pflanze benötigt (Laboure et al., 1993b). Es ist also notwendig, dass Phytat zu Orthophosphat und *myo*-Inositol abgebaut wird. Die Keimung von Samen oder Pollen führt zu einer rapiden Abnahme der Phytineinschlüsse, während es gleichzeitig zu einem Anstieg der Phytaseaktivität kommt, da dieses Enzym verantwortlich ist für den Abbau des Phytins (Laboure et al., 1993b).

In den meisten Fällen ist nicht klar, ob der rapide Anstieg der Phytaseaktivität das Ergebnis der Aktivierung von bereits existierendem Enzym ist oder auf der *de novo*-Synthese dieses Proteins beruht (Laboure et al., 1993b).

### 2.2.3 Chemische und biochemische Eigenschaften von Phytat

Ingelmann et al. (1993) nennen zur Protonenzahl und den Säurestärken der Phytinsäure Ergebnisse aus einer Veröffentlichung von Barré et al. (Barré et al., 1954): Durch potentiometrische Titration wurden sechs stark ( $pK_s = 1,84$ ), zwei schwach ( $pK_s = 6,30$ ) und vier sehr schwach azide Wasserstoffatome bestimmt (Ingelmann et al., 1993). Es gibt ein hohes Bindungspotential zu metallischen Kationen und positiv geladenen Molekülen.

Das antinutritive Potential der Phytinsäure resultiert aus der hohen Affinität zu polyvalenten Kationen und der dadurch bedingten Fällung essentieller Mengen- und Spurenelemente im Intestinum. Dieser Effekt basiert auf der Molekularstruktur von Phytat (Pallauf und Rimbach, 1997): Ist Phytat komplett dissoziiert, tragen die sechs Phosphatgruppen zwölf negative Ladungen. Das bedeutet, dass in schwach saurem pH verschiedene bi- und trivalente Kationen (z.B. Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn) in einen stabilen Komplex gebunden werden. Bei neutralem pH tragen die Phosphatgruppen entweder ein oder zwei negativ geladene Sauerstoffatome (Reddy et al., 1982). Es ist augenscheinlich, dass verschiedene Kationen starke Chelate zwischen zwei Phosphatgruppen oder schwächere Chelate mit einer Phosphatgruppe bilden können (Reddy et al., 1982), wie Erdman (1979) es gezeigt hat (Abbildung 4).

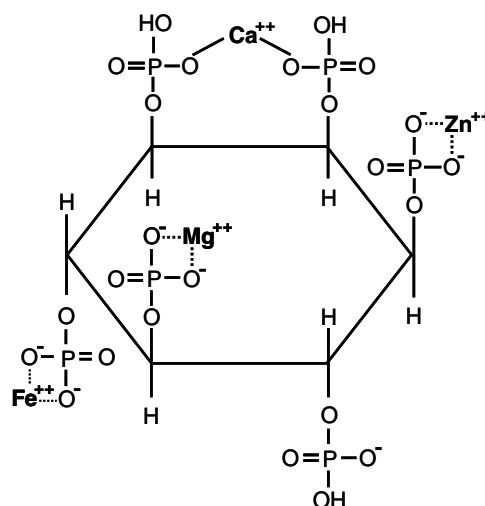


Abbildung 4: Phytinsäure- Chelat bei neutralem pH (Erdman, 1979)

Die Bioverfügbarkeit verschiedener essentieller Mineralien und Spurenelemente für die Monogastrier wird somit durch Komplexierung mit Phytat reduziert. Es handelt sich bei

Phytat um einen so genannten antinutritiven Faktor. Antinutritive Faktoren setzen den Nährwert eines Nahrungsmittels herab, indem sie die Verdaulichkeit oder Bioverfügbarkeit der Nährstoffe mindern (Sandberg, 2002). Zink ist das Spurenelement, dessen Bioverfügbarkeit durch Phytat am meisten beeinflusst wird (Pallauf und Rimbach, 1997).

Hohe Calcium-Konzentrationen erhöhen diesen antinutritiven Effekt von Phytat auf die Verfügbarkeit von Zink, indem sich unlösliche Calcium-Zink-Phytat-Komplexe bilden (Pallauf und Rimbach, 1997). Ein Mol Phytinsäure kann bei dem im Dünndarm vorliegenden pH-Wert 3-6 Mol Calcium in Form eines unlöslichen Phytats binden (Kornegay, 2001).

Die meisten Chelate mit divalenten mineralischen Kationen sind bei  $\text{pH} < 3,5$  löslich und weisen eine maximale Unlöslichkeit zwischen  $\text{pH} 4,0$  und  $7,0$  auf (Cheryan, 1980; Selle et al., 2000). Bei neutralem pH-Wert im Dünndarm präzipitiert die Phytinsäure (Schlemmer et al., 2001). Phytat liegt als Mineralkomplex vor, der bei physiologischem pH-Wert des Dünndarms unlöslich ist (Sandberg, 2002).

Des Weiteren hat Phytinsäure einen negativen Einfluss auf die Eisenabsorption aus dem Dünndarm: Phytinsäure und Eisen formen einen unlöslichen Komplex, der unter den pH-Bedingungen im Dünndarm nicht für die Absorption verfügbar ist (Rimbach und Pallauf, 1998). Um die Eisenabsorption wesentlich zu erhöhen, muss es zu einem nahezu vollständigen Phytatabbau kommen. Neuere Forschungsergebnisse lassen darauf schließen, dass Inositolpenta-, tetra- und triphosphat ebenso abgebaut werden müssen, um die Absorption von Eisen zu verbessern (Sandberg et al., 1999).

Cheryan (1980) berichtet, dass Phytinsäure die Bioverfügbarkeit vieler essentieller Mineralien durch Interaktion mit multivalenten Kationen und/oder Proteinen herabsetzt, indem Komplexe gebildet werden, die unlöslich oder unter physiologischen Bedingungen nicht verfügbar sind. Bei niedrigem pH und niedriger Kationen-Konzentration werden durch direkte elektrostatische Interaktion Phytat-Protein-Komplexe gebildet (Cheryan, 1980). Diese Fähigkeit, Proteine zu binden, ist die Folge der Kapazität von Phytat, Chelate zu bilden (Selle et al., 2000). Bei niedrigem pH-Wert existiert ein starker Ladungseffekt: Das Protein hat eine maximale positive Ladung und Phytat ist negativ geladen, woraus eine starke elektrostatische Anziehung resultiert (Cheryan, 1980; Anderson, 1985). Abbildung 5A zeigt die mögliche Struktur eines solchen Komplexes.

Wenn der pH-Wert ansteigt und sich dem isoelektrischen Punkt des Proteins nähert, wird die Ladung des Proteins neutralisiert, seine Löslichkeit ist minimal. Unter diesen Umständen ist Phytat löslich und nicht länger gebunden. Wird der pH auf neutrale oder alkalische Werte angehoben, fördert das die Löslichkeit sowohl des Proteins als auch des Phytats (Anderson, 1985). In diesem löslichen Zustand komplexiert Phytat erneut mit Proteinen (Cheryan, 1980). Es wird aber angenommen, dass diese Komplexbildung, wie in Abbildung 5B gezeigt, nur in Anwesenheit multivalenter Kationen, wie z.B. Calcium, möglich ist (Cheryan, 1980). Die ionisierten Carboxylgruppen, wie als Beispiel in der Abbildung gezeigt, sind aber nicht die einzigen Stellen, an denen es eine Protein-Salz-Bindung geben kann (Cheryan, 1980). Tatsächlich handelt es sich bei der Imidazolgruppe des Histidin um eine wahrscheinlichere Bindungsstelle (Cheryan, 1980).

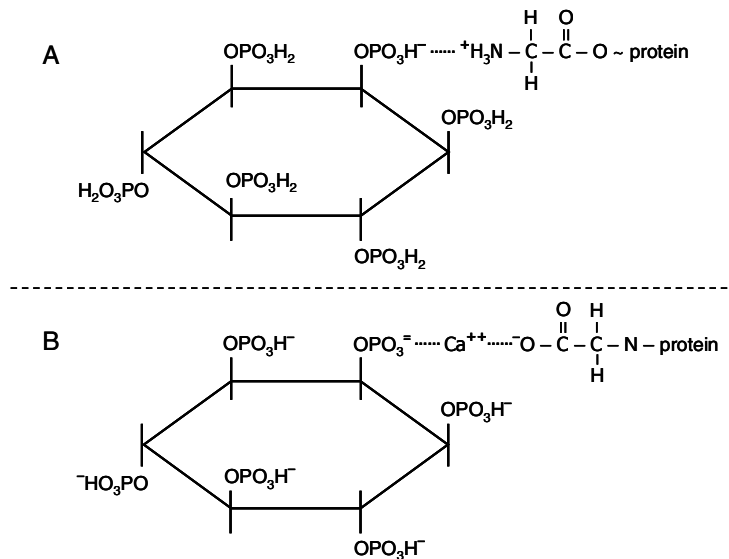


Abbildung 5: Phytinsäure-Protein-Komplex bei niedrigem (A) und neutralem pH (B) (Anderson, 1985)

Durch Bindung von Phytat an Kationen und Proteine ist Phytat in der Lage, die Aktivität von Verdauungsenzymen zu vermindern. Phytat ist dazu fähig, das Verdauungsenzym  $\alpha$ -Amylase zu hemmen. Es handelt sich hierbei um eine nicht kompetitive Hemmung und steht daher eher im Zusammenhang mit der generellen Fähigkeit des Phytats, mit Proteinen Komplexe zu formen, als mit einer Bindungsstelle am Enzym (Deshpande und Cheryan, 1984).

Die *in-vitro*-Aktivität des proteolytischen Enzyms Trypsin wurde bei Verwendung von Kasein wesentlich durch niedrige Konzentrationen an *myo*-Inositolhexaphosphat gehemmt. Dieser inhibitorische Effekt der Phytinsäure könnte mit der Bindung der Phytinsäure an das Trypsin-Calcium zusammenhängen (Singh und Krikorian, 1982).

Die Effekte von Phytat auf die Aktivität der laktosespaltenden  $\beta$ -Galaktosidase-Enzyme aus Rinderleber und *Escherichia coli* wurde in einem *in-vitro*-Versuch von Inagawa et al. (1987) untersucht. Die Autoren stellten fest, dass die Enzyme mit steigender Phytatkonzentration zunehmend gehemmt wurden (Inagawa et al., 1987). Inagawa et al. (1987) schlossen aus dieser Tatsache, dass es sich bei Phytat um einen nicht-kompetitiven Hemmer der  $\beta$ -Galaktosidase handelt und Phytat mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-Laktose-Komplex interagiert.

Um den Phytat-Phosphor und die Mineralien und Spurenelemente, die als Komplex mit dem Phytat verbunden sind, nutzen zu können, ist die Hydrolyse der nach dem Estertyp gebundenen Phosphatgruppen des Phytats durch Phytasen notwendig (Pallauf und Rimbach, 1997).



Phytat hat auch positive Eigenschaften, von denen im Folgenden einige aufgezählt werden:

1. Interaktionen von Phytat mit Schwermetallen (Blei und Cadmium):
  - a) Geringe Cadmium- und Eisenkonzentrationen kann Phytat nicht ausfällen, aber in der Anwesenheit von Calcium wird ein Präzipitat geformt, das die beiden toxischen Stoffe bindet (Wise und Gilbert, 1981).
  - b) Phytat vermindert erheblich die Absorption von Cadmium aus dem Darm (Jackl et al., 1985).
2. Natürlichem Inositol-Hexakisphosphat (InsP6) wird eine Antitumorwirkung zugesprochen. Yang und Shamsuddin (1995) zeigten in einer *in-vitro*-Studie eine signifikante dosis- und zeitabhängige Wachstumshemmung von menschlichen HT-29 Kolonkarzinom-Zellen mit Suppression der DNA-Synthese und eine Niederregulierung der Expression eines PCNA-Proliferationsmarkers. Da InsP6 als natürlicher Inhaltsstoff in Getreide und Leguminosen vorkommt und das Wachstum von Kolonkarzinomzellen hemmt sowie deren Enddifferenzierung herbeiführt, ist InsP6 ein hervorragender Kandidat als Chemotherapie-Hilfsmittel und zur Verhütung von Krebs (Yang und Shamsuddin, 1995). Der exakte Mechanismus der Antitumorwirkung von InsP6 ist noch nicht bekannt. Eine Möglichkeit hängt mit der Tatsache zusammen, dass Phytat die Fähigkeit besitzt, divalente Kationen zu chelatisieren (Pallauf und Rimbach, 1997) und Proteinkomplexe zu bilden (Cheryan, 1980), denn Metalloproteine spielen eine strukturelle und katalytische Funktion in der Genexpression (O'Halloran, 1993). Die metalloregulatorischen Proteine sind eine Subklasse, die mittels des Metalls eine Kontrolle über die Gene ausüben, die in den Stoffwechsel und die metallspezifische Homöostase involviert sind (O'Halloran, 1993).
3. Phytat könnte durch seine chelatisierenden Eigenschaften die Metall-Homöostase beeinflussen und dadurch die Zellproliferation und- differenzierung modulieren (Yang und Shamsuddin, 1995).
4. In einer Patentschrift zur Behandlung der multiplen Sklerose wird der Einsatz von Phytat, ggf. zusammen mit 3-Phytase, empfohlen (US 5217959 A, 1990).
5. Phytat ist ein natürliches Antioxidans (Graf et al., 1987): Bei Phytat handelt es sich um einen potenten Inhibitor der Hydroxyl-Radikal-Bildung, was auf sein Potential zurückzuführen ist, mit Eisen ein Chelat zu bilden (Graf et al., 1987; Rimbach und Pallauf, 1998). Die Unterdrückung der antioxidativen Vorgänge, die normalerweise von freiem Eisen und Eisen-Chelaten katalysiert wird, ist eine Funktion der großen Mengen an Phytat in Pflanzensamen, Getreide, Leguminosen, Nüssen und Blütenstaub (Graf et al., 1987). Als natürliches Antioxidans pflanzlichen Ursprungs hemmt Phytinsäure die Oxidation (Peroxidation) von Fetten und begleitende Läsionen der Intestinal- und Leberzellen (De Stefano et al., 2003).
6. Bei *D-myo*-Ins(1,4,5)-Trisphosphat handelt es sich um einen „second messenger“: Dieses Trisphosphat wird rezeptorvermittelt freigesetzt und reguliert durch Calciummobilisierung aus internen Speichern und evtl. indirekt über Stimulation des

Calciumeintritts den intrazellulären Calciumspiegel (Berridge und Irvine, 1989). Bei dieser Aktion agiert  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  möglicherweise mit  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  gemeinsam (Berridge und Irvine, 1989).

## 2.2.4 Verdaulichkeit von Phytat im Darm von Nutztieren

Phytat kann nicht aus dem Darm von Nutztieren resorbiert werden und wird außerdem von den meisten monogastrischen Nutztieren (z.B. Schweine, Geflügel, Fische) schlecht abgebaut. Dies ist der Fall, weil bei Monogastriern die entsprechenden Enzyme, Phytasen nur in geringer, von Spezies zu Spezies unterschiedlicher Menge im Verdauungstrakt vorkommen oder gänzlich fehlen (Cooper und Gowing, 1983; Williams und Taylor, 1985).

Schweine haben beispielsweise eine sehr geringe Phytaseaktivität im Darm, weshalb sie auf endogene Phytase aus Weizen oder anderen Getreidesorten oder auf supplementierte Phytasequellen zurückgreifen müssen. Andernfalls können die Schweine den größten Teil des Phytats nicht nutzen und dieses wird letztlich mit der Faeces ausgeschieden (Cromwell et al., 1995).

Die Verdaulichkeit von Phosphor in Rationskomponenten für Schweine kann bei manchen Rationen durch Zugabe von mikrobieller Phytase zum Futter erhöht werden. Rodehutschord et al. ermittelten in Bilanzversuchen bei Schweinen die Verdaulichkeit des Phosphors aus Gerste, Sojaextraktionsschrot und vier unterschiedlichen Weizensorten (Rodehutschord et al., 1996). Die Verdaulichkeit des Phosphors aus Gerste und Sojaextraktionsschrot lag bei 45% und 31%. Durch Zugabe von Phytase zur Ration konnte die P-Verdaulichkeit signifikant erhöht werden auf 66% respektive 73%. Die Verdaulichkeit des Phosphors aus Weizen schwankte je nach Sorte zwischen 61% und 74%. Eine Verbesserung der P-Verdaulichkeit durch Phytasesupplementierung konnten die Wissenschaftler im Falle der Weizensorten nicht beobachten (Rodehutschord et al., 1996).

## 2.3 Phytasen

### 2.3.1 Allgemeine Beschreibung

Phytasen sind Enzyme, das bedeutet, dass sie chemische Prozesse teilweise um das  $10^6$ -fache beschleunigen, ohne dabei selbst aufgebraucht zu werden (Spring, 2006). Das Enzym wird nach der Reaktion wieder freigesetzt und kann die nächste Reaktion katalysieren. Enzyme sind sehr spezifisch, das bedeutet, dass jedes Enzym nur ganz bestimmte Reaktionen katalysieren, Verbindungen herstellen bzw. abbauen kann (Spring, 2006).

Phytasen sind Enzyme, die Phytat hydrolysieren (Kerovuo und Tynkkynen, 2000). Bei dieser Hydrolyse werden nacheinander die Phosphatgruppen vom *myo*-Inositol abgespalten. Das so freigesetzte Orthophosphat ist dann für den Organismus verfügbar.

1961 hat die internationale Enzymkommission (Enzyme Commission, E.C.) Regeln aufgestellt, nach welchen die Enzyme nach der Art der von ihnen katalysierten Reaktion in sechs Hauptklassen eingeteilt werden (Spring, 2006). Danach zählen die Phytasen zur Enzymhauptklasse der Hydrolasen. Diese Enzyme kommen in Pflanzen, einigen tierischen Geweben und Mikroorganismen vor (Greiner et al., 1993). Diese Enzyme katalysieren die

Abspaltung der Phosphatmonoester von der Phytinsäure bzw. von deren Salzen. Die Produkte dieses enzymatischen Vorgangs sind *myo*-Inositolpentakis-, -tetrakis-, -tris-, -bis- und -monophosphat und anorganisches Phosphat. Aufgrund dieser Spaltprodukte nennt man Phytasen Phosphomonoesterhydrolasen. Sie gehören zu der Gruppe der Phosphatasen, welche eine Gruppe der Hydrolasen darstellen und die E.C.-Nummer 3.1 besitzen (Spring, 2006).

Wie bereits erwähnt haben die durch die Hydrolyse der Phosphatgruppen entstehenden *myo*-Inositolphosphate mit weniger als sechs Phosphatgruppen (v.a. Mono-, Bis- und Trisphosphat) bedeutende Funktionen im Organismus (siehe Abschnitt 2.2.3). Glykosilierte Formen von Phosphatidylinositol spielen eine wichtige Rolle in der Funktion biologischer Membranen: Über diese Moleküle erfolgt eine Verankerung der Zelloberflächenproteine an der Membran (Low und Saltiel, 1988).

Derzeit sind fünf Gruppen von Phosphatasen charakterisiert. Sie werden zu den sauren oder alkalischen Phosphatasen gezählt, je nachdem, ob der optimale pH-Wert für die Katalyse unter- oder oberhalb von pH 7,0 liegt (Vincent et al., 1992; Oh et al., 2004):

- 1) Alkalische Phosphatasen
- 2) Purpursäurephosphatasen
- 3) niedermolekulare saure Phosphatasen
- 4) hochmolekulare saure Phosphatasen
- 5) Proteinphosphatasen

Diese Klassen unterscheiden sich in pH-Optimum, Substratspezifität, der Forderung nach Kofaktoren (Metallionen) und sogar im Reaktionsmechanismus (Vincent et al., 1992; Kerovuo et al., 2000a). Die Phytasen weisen mit Ausnahme der *Bacillus*-Phytase alle das Aminosäuren-Sequenzmotiv RHGXRXP auf. Dieses Motiv ist charakteristisch für das aktive Zentrum der sauren Histidin-Phosphatasen (Kerovuo et al., 2000a). Es handelt sich bei der Sequenz RHGXRXP um den Einbuchstaben-Code für Aminosäuren: „R“ steht für die Aminosäure Arginin, „H“ für Histidin, „G“ für Glycin, „P“ für Prolin und das „X“ steht für nicht spezifizierte bzw. nicht-Standard-Aminosäuren.

Basierend auf ihren Enzym-Charakteristiken und Aminosäure-Sequenzhomologien bilden Phytasen - mit Ausnahme der *Bacillus*-Phytasen - eine neue Subfamilie der sauren Histidin-Phosphatasen, sind also zu der Gruppe der sauren Phosphatasen zu zählen (Mitchell et al., 1997).

Unter Berücksichtigung des Endproduktes des Phytatabbaus können Phytasen in zwei Gruppen eingeteilt werden (Greiner et al., 2002b):

Einerseits setzen Enzyme, die ein saures pH-Optimum haben, fünf oder sogar alle sechs Phosphatgruppen des Phytats frei, so dass *myo*-Inositol-Monophosphat oder sogar reines *myo*-Inositol die Endprodukte dieser Phytasen darstellen. Auf der anderen Seite sind alkalische Phosphatasen nicht in der Lage, ein *myo*-Inositolphosphat mit drei oder weniger Phosphatresten als Substrat zu akzeptieren (Greiner et al., 2002b). Daher ist *myo*-Inositol-Trisphosphat das Endprodukt dieser alkalischen Phytasen (Greiner et al., 2002b). Diese Art des Abbaus ist wahrscheinlich für die *Bacillus*-Phytase (siehe Abschnitt 2.3.4.3).

Bezüglich des Abbaumechanismus unterscheidet die „International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry“ (IUPAC-IUB) unter den sauren Histidinphosphatasen zwei Phytasetypen: 3-Phytasen (E.C. 3.1.3.8) und 6-Phytasen (E.C. 3.1.3.26) (Oh et al., 2004). Die Einteilung erfolgt in Abhängigkeit davon, an welcher Position des Inositolringes das Enzym mit der Hydrolyse der ersten Phosphatgruppe beginnt (Greiner et al., 1993). Es wurde keine EC-Nummer für alkalische Phytasen vergeben (Oh et al., 2004).

3-Phytasen sind weitestgehend mikrobiellen Ursprungs und 6-Phytasen in den meisten Fällen pflanzlichen Ursprungs. Die bakterielle *E.coli*-Phytase wurde allerdings als 6-Phytase charakterisiert und stellt somit eine Ausnahme dar (Greiner et al., 1993; Greiner et al., 2000). Auch die von Kerovuo et al. (2000b) beschriebene *Bacillus*-Phytase macht hier eine Ausnahme, da sie sowohl 3- als auch 6-Phytase-Aktivität zeigt.

Alle Phytasen sind monomere Proteine, ausgenommen die Phytase B von *Aspergillus niger*, bei welcher es sich um ein Tetramer handelt (Oh et al., 2004).

Viele Pilze, Bakterien und Hefen sind in der Lage, Phytasen zu produzieren. Mit der industriellen Produktion von Phytasen hat die Supplementierung dieses Enzyms zu Schweine- und Geflügeldiäten begonnen, mit dem Ziel, die Phosphorverfügbarkeit zu erhöhen und die Leistung dieser Nutztiere zu verbessern. Ein weiterer positiver Effekt ist die Verminderung der Umweltbelastung durch die hohe Ausscheidungsrate an unverdaulichem Phytat-Phosphor.

500 Units 3-Phytase oder 750 Units 6-Phytase je kg Futter erzeugen durch Freisetzung von Phosphat aus dem Phytat etwa 0,8g verdaulichen P/kg. Dies erfüllt etwa der Hälfte des Bedarfs an verdaulichem Phosphor in der Schweineendmast (Jongbloed und Kemme, 2002).

Mikrobielle Phytase ist als Futterzusatzstoff gut geeignet, da sie ein niedriges pH-Optimum hat und somit eine Kompatibilität mit den Konditionen im Magen aufweist, in welchem Phytat meist löslich ist (Campbell und Bedford, 1992).

Nachdem eine preiswerte Phytase (*Aspergillus niger*-Phytase Natuphos®, BASF, Mount Olive, N.Y) seit 1993/94 als erster rekombinanter Produktionsstamm als Futterzusatzstoff zugelassen wurde, hat sich der Zusatz exogener Phytase zur Ration monogastrischer Tiere in vielen europäischen Ländern und den USA durchgesetzt. In den Niederlanden wird beispielsweise in 80% der Futtermittel für Schweine mikrobielle Phytase eingesetzt (Jongbloed und Kemme, 2002).

In den Versuchen von Cromwell et al. (1995) hat sich gezeigt, dass das Enzym Phytase die Bioverfügbarkeit des Phytat-Phosphors um ein Dreifaches verbessert. Daraus lässt sich schließen, dass das Zufüttern von Phosphor durch die Supplementierung von Phytasen unnötig wird.

### 2.3.2 Pflanzliche Phytasen

Obwohl der Großteil des pflanzlichen Phosphors in der Pflanze als Phytin gebunden vorliegt, ist die Verdaulichkeit des Phosphors der unterschiedlichen pflanzlichen Futtermittel sehr verschieden (Rodehutscord, 2001). Das liegt vor allem daran, dass in den meisten Pflanzensamen sowohl Phytat als auch Phytasen vorkommen (Reddy et al., 1982). Mehrere

Wissenschaftler haben Phytasen aus unterschiedlichen Pflanzenarten isoliert und charakterisiert.

Die pflanzlichen Phytasen können im Verdauungstrakt der Tiere ihre Wirkung entfalten und tragen so zur Verdauung des Phosphors bei (Rodehutsord, 2001). In Rationen mit phytasereichen pflanzlichen Futtermitteln, wie z.B. einer weizenreichen Schweine- oder Geflügelration, ist es daher für die Verdaulichkeit von großer Bedeutung, ob die Aktivität dieser nativen Phytase während der Verarbeitung und Lagerung des Futtermittels erhalten geblieben ist oder nicht (Rodehutsord, 2001). Die beim Pelletieren und Konditionieren von Futtermitteln erreichte Temperatur von > 70°C und die Feuchtigkeit reichen oft aus, um zu einer erheblichen Verminderung der Phytaseaktivität zu führen.

Phytasen kommen unter anderem in Getreidearten wie Triticale (Singh und Sedeh, 1979), Weizen (Peers, 1953; Nagai und Funahashi, 1962), Mais (*Zea mays* L. var. Marcross) (Chang, 1967; Laboure et al., 1993a) und Roggen (Greiner et al., 1998), in weißen Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) (Gibbins und Norris, 1963; Lolas und Markakis, 1977), Mungobohnen (Mandal und Biswas, 1970) und Sojabohnen (Gibson und Ullah, 1988) vor. Die Phytaseaktivitäten einiger pflanzlicher Futtermittel sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Phytaseaktivität in Futtermitteln (Eeckhout und De Paepe, 1994)

Futtermittel	n	Phytaseaktivität (U/kg)	
		Mittelwert ± Standardabw.	min-max
Roggen	2	5130	4132-6127
Triticale	6	1688 ± 227	1475-2039
Weizen	13	1193±223	915-1581
Gerste	9	582±178	408-882
Erbsen	11	116±54	36-183
Weizenkleie- Pellets	15	2573±0,59	1206-4230
Weizenkleie	5	2975±1556	1180-5208
Reiskleie	2	122	108-135
Mais	11	15±18	0-46
Hafer	6	42±50	0-108
Erdnüsse	3	3	0-8
Leinsamen (Expeller)	4	5±6	0-12
Sojabohnen (erhitzt)	4	55±89	0-188
Lupinen	1	0	0
Ackerbohne (erhitzt)	1	81	-

Singh und Sedeh (1979) fanden für die Phytase aus Triticale ein pH-Optimum von 5,4 und eine optimale Temperatur bei 45°C. Für Weizenkleie konstantierten Nagai und Funahashi (1962) einen optimalen pH-Wert von 5,0. Peers (1953) ermittelte für die Weizen-Phytase einen optimalen pH-Wert von 5,15 und eine optimale Temperatur von 55°C. Chang (1967) stellte für Mais ein pH-Optimum von 5,6 und eine Optimaltemperatur von 50°C fest. Laboure et al. (1993a) fanden hingegen für Mais (*Zea mays*) ein Temperatur-Optimum bei 55°C und ein pH-Optimum bei 4,8. Die Phytaseaktivität fiel rapide ab bei pH-Werten von > 5,0 und bei Temperaturen von über 55°C.

Greiner et al. (1998) reinigten eine 6-Phytase (EC 3.1.3.26) mit einem Molekulargewicht von etwa 67 kDa aus Roggen var. Amando. Das Enzym hat ein pH-Optimum bei pH 6,0 und ist

praktisch inaktiv unterhalb pH 3,0 und oberhalb pH 8,0. Das Temperatur-Optimum für die Roggen-Phytase liegt bei 45°C. Für *Phaseolus vulgaris* ermittelten Lolas und Markakis (1977) die optimalen Werte für die Aktivität der Phytase bei pH 5,3 und einer Temperatur von 50°C mit Phytinsäure als Substrat. Gibbins und Norris (1963) konstatierten den optimalen pH für *Phaseolus vulgaris* bei pH 5,2. Die Phytase keimender Mungobohnen hatte optimale Bedingungen für ihre Aktivität bei pH 7,5 und 57°C (Mandal und Biswas, 1970). Gibson und Ullah (1988) entdeckten eine Phytase aus den Kotyledonen keimender Sojabohnen. Der isoelektrische Punkt für diese Phytase lag bei 5,5, das pH-Optimum bei 4,5 - 4,8 und die Optimaltemperatur bei 55°C. Die Sojabohnen-Phytase hatte eine hohe Affinität für Phytinsäure. Im Allgemeinen liegt demnach das pH-Optimum für die Phytaseaktivität pflanzlicher Phytasen in einem Bereich von pH 4,0 - 7,5 und die Optimaltemperatur variiert je nach Art von 45 - 60°C (Reddy et al., 1982).

In Tabelle 2 sind die oben genannten pflanzlichen Phytasen und ihre Eigenschaften aufgeführt.

Mihailovic et al. (1965) stellten fest, dass im Falle von Weizen Phytat am siebenten Tag der Keimung vollständig verschwunden war. Die Autoren setzten Papierchromatographie ein und untersuchten mit dieser Methode Extrakte von Weizen, die aus verschiedenen Stadien der Keimung gewonnen wurden. Mihailovic et al. schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die enzymatische Hydrolyse schrittweise über die Bildung von Zwischenstufen (Penta-, Tetra-, Tri-, Di- und Monophosphat des *myo*-Inositols) stattfindet.

Die Hydrolyse von Phytat variiert bei der Keimung der verschiedenen Leguminosen stark (Reddy et al., 1982). Der Prozentsatz hydrolisierten Phytats in verschiedenen Leguminosen reicht von 20% bis 77% nach einer Keimungszeit von fünf Tagen. Die vollständige Hydrolyse des Phytats fand während fünftägiger Keimung bei den Leguminosen nicht statt. Das Vorhandensein von Phytat während der Keimung hängt von der Aktivität der Phytase ab. Es besteht eine deutliche Wechselbeziehung zwischen dem Rückgang des Phytats und der Phytaseaktivität während der Keimung (Reddy et al., 1982). Auch für *Phaseolus vulgaris* stellten Lolas und Markakis (1977) diesen Zusammenhang fest. Eine Keimung der Bohnen verursachte einen Zuwachs an Phytase und einen Rückgang von Phytinsäure.

Tabelle 2: Pflanzliche Phytasen und ihre Eigenschaften

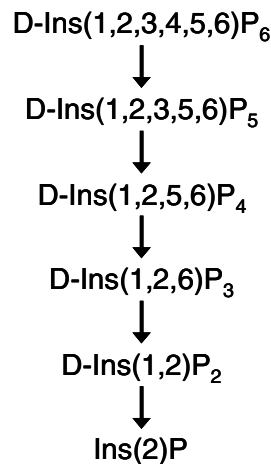
Herkunft der Phytase	Molekulargewicht (kDa)	pH-Optimum	Inaktiv bei pH	Temperatur-Optimum	Endprodukt des Phytat-abbaus	Literatur
<i>Phaseolus aureus</i> (Mungobohne)	–	7,5	–	57°C	–	(Mandal und Biswas, 1970)
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Weiße Bohne)	–	5,3	>6,0	50°C	–	(Lolas und Markakis, 1977)
Sojabohne	59-60	4,5-4,8	>5,6	55°C	–	(Gibson und Ullah, 1988)
Roggen	67	6,0	<3,0 >8,0	45°C	–	(Greiner et al., 1998)
<i>Zea mays</i> (Mais)	38	4,8	>6,0	55°C	–	(Laboure et al., 1993a)
<i>Zea mays</i> (Mais)	–	5,6	<4,0 >8,0	50°C	–	(Chang, 1967)
Weizen	–	5,15	–	55°C	–	(Peers, 1953)
Weizenkleie	–	5,0	–	–	–	(Nagai und Funahashi, 1962)
Triticale	–	5,4	6,0	45°C	–	(Singh und Sedeh, 1979)
( <i>Triticum aestivum</i> ) Weizenkleie	–	–	–	–	myo-Inositol	(Nakano et al., 2000)
<i>Lupinus albus</i> (Weiße Lupine)	–	–	–	–	Ins (2)P	(Greiner et al., 2002b)
<i>Vicia faba</i> (Ackerbohne)	–	–	–	–	Ins (2)P	(Greiner et al., 2002b)

Greiner et al. (2002b) setzten mit Hilfe einer Kombination aus HPLC (Ionenaustauscher)-Analyse und kinetischen Studien den Weg der Dephosphorilierung der aus verschiedenen Leguminosensamen gewonnenen Phytasen fest (Abbildung 6). Die Phytase aus den Samen von *Vicia faba* var. Alameda und die LP2-Phytase aus Samen von *Lupinus albus* var. Amiga hydrolysierten Phytat durch schrittweise Entfernung der Phosphatgruppen über D-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub>, D-Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>, D-Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> und D-Ins(1,2)P<sub>2</sub> und letztendlich zu Ins(2)P. Die LP11- und LP12-Phytasen aus *Lupinus albus* hingegen stellten das Endprodukt Ins(2)P via D-Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>, D-Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>, D-Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> und D-Ins(1,2)P<sub>2</sub> her. Die myo-Inositol-Hexa- und Pentakisphosphate waren nach 90 Minuten Inkubationszeit vollständig abgebaut zu den niederen myo-Inositolphosphaten InsP<sub>4</sub>, InsP<sub>3</sub> und InsP<sub>2</sub>. Die Phytasen von *Lupinus albus* LP11 und LP12 sind also aufgrund des ersten Schrittes ihres Abbauweges zu den 3-Phytasen zu zählen. Die LP11- und LP12-Phytasen stellen demnach

eine Ausnahme unter den pflanzlichen Phytasen dar, die sonst größtenteils zu den 6-Phytasen zählen.

Es fällt auf, dass die *Vicia faba*- und die *Lupinus albus* LP2-Phytasen zuerst die vierte Phosphatgruppe abspalten. Da aber je nach Zählweise (D- oder L-Zählung) die sechste und die vierte Phosphatgruppe identisch sind, zählen diese beiden zu den 6-Phytasen (Greiner et al., 2002b).

*Lupinus albus* LP2 und *Vicia faba*



*Lupinus albus* LP11 und LP12

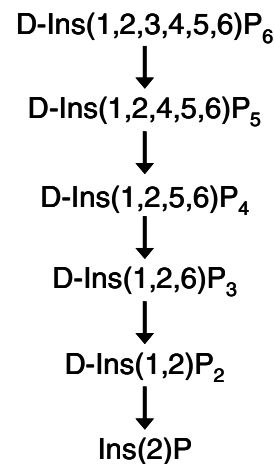


Abbildung 6: Abbauwege der Leguminosen-Phytasen von *Lupinus albus* LP2 und *Vicia faba* und *Lupinus albus* LP11 und LP12 (Greiner et al., 2002b)

Nakano et al. (2000) untersuchten mit Hilfe von verschiedenen nuklearmagnetischen Resonanztechniken, Gaschromatographie und einem Bioassay den Weg der Dephosphorilierung einer Phytase der Weizenkleie von *Triticum aestivum* L. cv. Nourin #61. Sie fanden heraus, dass es einen Hauptweg und einen Nebenweg der Dephosphorilierung gibt (Abbildung 7). Zunächst wird vom InsP<sub>6</sub> die Phosphorgruppe an vierter Position abgespalten, um D/L-Ins(1,2,3,5,6)P<sub>5</sub> zu erhalten. Nach diesem ersten Schritt geht es auf dem Hauptweg der Dephosphorilierung weiter mit der Abspaltung der Phosphatgruppen, so dass nacheinander D/L-Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>, D/L-Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> und D/L-Ins(1,2)P<sub>2</sub> gebildet werden. Auf dem Nebenweg entstehen im zweiten Schritt D/L-Ins(1,2,3,6)P<sub>4</sub> und anschließend D/L-Ins(1,2,3)P<sub>3</sub> und im vierten Schritt entsteht ebenfalls wie auch im Hauptweg D/L-Ins(1,2)P<sub>2</sub>. Schließlich wird auf beiden Wegen entweder die erste oder die zweite Phosphorgruppe abgespalten, so dass Ins(1)P oder Ins(2)P entsteht. Am Ende wird auch noch die letzte verbleibende Phosphorgruppe hydrolysiert, so dass das Endprodukt *myo*-Inositol ist. Es ist auch hier bemerkenswert, dass diese Phytase zuerst die vierte Phosphatgruppe abspaltet. Auch in diesem Fall kann man die *Triticum aestivum*-Phytase zur Gruppe der 6-Phytasen zählen, wenn man die D-Zählung anwendet.



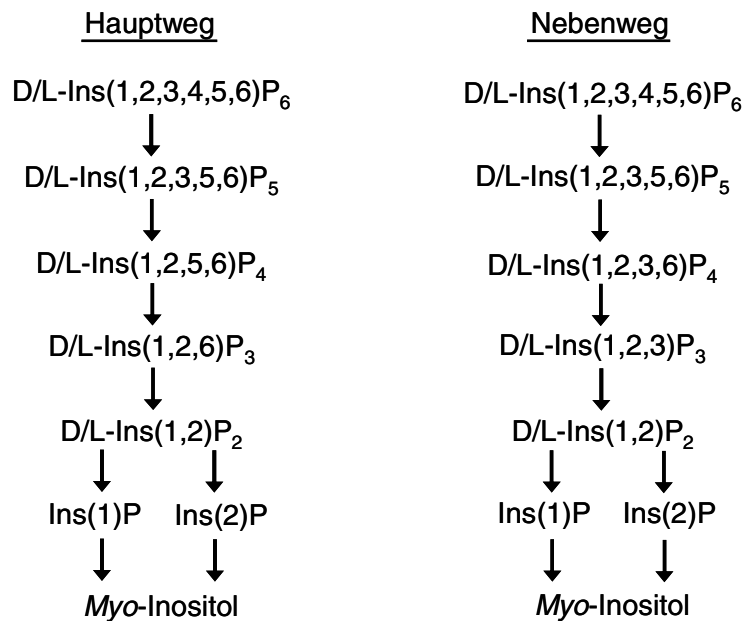


Abbildung 7: Abbauwege der Phytase von *Triticum aestivum* (Nakano et al., 2000)

### 2.3.3 Pilzliche Phytasen

#### 2.3.3.1 *Aspergillus*-Phytase

Die *Aspergillus*-Phytase ist eine 3-Phytase pilzlichen Ursprungs.

Es sind mehrere Phytasen mit Genen verschiedener *Aspergillus*-Stämme bekannt. Das Gen der ersten kommerziell erhältlichen *Aspergillus*-Phytase Natuphos® stammt von *Aspergillus ficuum* und wird produziert im Stamm *Aspergillus niger*.

Der Vertreiber BASF gibt für Natuphos® zwei verschiedene pH-Optima an: Nach oraler Einnahme mit dem Futter beginnt das Enzym bereits im Kropf von Geflügel zu arbeiten. Weiterhin ist Natuphos® ebenfalls bei relativ niedrigen pH-Werten, wie sie in der Fundusregion des Magens vorherrschen, aktiv. Auch hier kann anorganisches Phosphat aus Phytat freigesetzt werden. Allerdings weist das *Aspergillus niger*-Enzym im neutralen pH-Bereich des Dünndarms keine Aktivität mehr auf.

Igbasan et al. (2000) untersuchten verschiedene Phytasen auf ihre Eigenschaften, unter anderem die Phytasen A und R mit *Aspergillus ficuum*-Gen und die Phytase *Aspergillus T* mit dem Gen von *Aspergillus awamori*. Diese Phytasen werden auf kommerziellem Weg als Futterzusatzstoffe produziert. Die Produktionsorganismen sind für Phytase A *Aspergillus niger*, für Phytase R Raps (*Brassica napus*) und für Phytase T *Trichoderma reesei*.

Die Autoren fanden für die *Aspergillus* A- und R-Phytase ein pH-Optimum von 5,5 und für das *Aspergillus awamori*-Enzym einen optimalen pH-Wert von 5,0. Sie konstatierten weiterhin, dass die Enzyme aller drei *Aspergillus*-Arten ab einem pH-Wert von 7,5 inaktiv sind. Für alle drei *Aspergillus*-Enzyme, die Igbasan et al. (2000) untersuchten, stellten sie ein Temperaturoptimum von 50°C fest. Die Verfasser untersuchten ebenfalls die Temperaturstabilität dieser Enzyme in Pelletierungsversuchen. Das Pelletieren erfolgte bei Temperaturen von 60°C, 70°C und 80°C. Die Temperaturen wurden im Konditionierer der Pelletierungsanlage gemessen. Es wurde nach dem Pelletieren bei 60°C für *Aspergillus A*

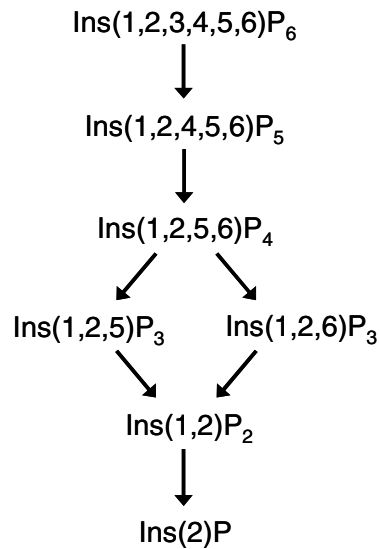
noch eine Aktivität von 92,6%, für *Aspergillus* R 84% und für *Aspergillus* T lediglich 51,9% Aktivität festgestellt. Nach dem Einwirken von Pelletierungstemperaturen von 70°C auf die Enzyme wiesen *Aspergillus* A 70,5%, *Aspergillus* R 62,3% und *Aspergillus* T noch 25% ihrer ursprünglichen Aktivität auf. Beim Pelletieren mit Temperaturen von 80°C verloren die drei Enzyme noch mehr Aktivität, es wurden Restaktivitäten von 30,9% 19,8% und 6,5% festgestellt.

BASF macht für das Enzym Natuphos® folgende Angaben über den Aktivitätsverlust beim Pelletieren: Natuphos® verliert bei Temperaturen von 65°C 0%-10%, bei 70°C 10%-20% und bei 75°C 15%-35% der ursprünglichen Aktivität. Bei Temperaturen von über 75°C denaturiert Natuphos®.

Über die proteolytische Stabilität gegenüber Pepsin- und Pankreatin-Lösung ist zu sagen, dass sie bei allen drei von Igbasan et al. (2000) untersuchten Enzymen nicht sehr groß ist. Nach 60 Minuten Inkubationszeit bei 40°C mit den Verdauungsenzymen (in wässriger Lösung) wies *Aspergillus* A noch 25,9% Aktivität bei Pepsin und 22,6% bei Pankreatin auf. *Aspergillus* R hatte noch 32,2% bzw. 26,7% der Aktivität und *Aspergillus* T nur noch 8,1% bzw. 0% seiner ursprünglichen Aktivität.

Die restliche Phytaseaktivität nach 60 Minuten Inkubation bei 40°C mit Lösungen aus verschiedenen Digesta-Überständen des Gastrointestinaltraktes von Hühnern wurde ebenfalls gemessen (Igbasan et al., 2000). Es wurden Restaktivitäten von 98,5% (Kropf), 60,4% (Magen), 93,6% (Duodenum), 60,2% (Jejunum) und 54,5% (Ileum) für die Phytase *Aspergillus* A festgestellt. Für Phytase *Aspergillus* R stellten die Autoren folgende verbleibende Phytaseaktivität nach 60 Minuten fest: 97,4%, 67,8%, 96,4%, 90,0% und 81,3%. Phytase *Aspergillus* T zeigte noch 92,6% Aktivität nach Inkubation mit Lösung aus Kropfinhalt, 56,8% nach Inkubation mit Mageninhalts-Lösung und 90,3%, 42,9% und 56,4% nach Inkubation mit Duodenal-, Jejunal- und Ileallösung.

Skoglund et al. (1997) setzten eine schnelle und hochempfindliche High Performance Ion Chromatography (HPIC)-Methode ein, um Inositol- Mono- und Diphosphate zu trennen und quantitativ zu bestimmen. Die Autoren setzten dazu pulsierte Amperometrie (Pulsed Amperometric Detection, PAD) ein. Die pulsierte Amperometrie ist eine sehr empfindliche Bestimmungsmethode, die für die Bestimmung von Zuckern und Alkoholen mit niedriger spezifischer Leitfähigkeit und geringer UV-Absorption gut geeignet ist. Mittels dieser Methode fanden Skoglund et al. (1997) für den Abbau von Phytat durch die *Aspergillus niger*-Phytase als Endprodukt das Monophosphat Ins(2)P. Als gesamten Abbauweg schlugen die Autoren den in Abbildung 8 gezeigten Ablauf vor.

Abbauweg der *Aspergillus niger*-PhytaseAbbildung 8: Abbauweg der *Aspergillus niger*-Phytase (3-Phytase) (Skoglund et al., 1997)**2.3.3.2 *Peniophora*-Phytase**

Das Gen der *Peniophora*-Phytase, die Igbasan et al. (2000) auf ihre Eigenschaften untersuchten, stammt von *Peniophora lycii*. Die Phytase wurde produziert in *Aspergillus oryzae*. Das pH-Optimum für die *Peniophora*-Phytase fanden die Autoren bei pH 4,5 und das Temperatur-Optimum bei 50°C. Diese Phytase ist bei pH-Werten < 2 und bei pH 7 inaktiv. Die *Peniophora*-Phytase erwies sich als nicht sehr hitzestabil: Nach 120 Minuten Inkubation in wässriger Lösung bei 50°C hatte die Phytase nur noch etwa 65% Restaktivität. Nach 120 Minuten bei 60°C und sonst gleichen Bedingungen stellten Igbasan et al. (2000) für die *Peniophora*-Phytase eine Restaktivität von ca. 10% fest. Nach 120 Minuten bei 70°C in wässriger Lösung war die *Peniophora*-Phytase komplett inaktiv.

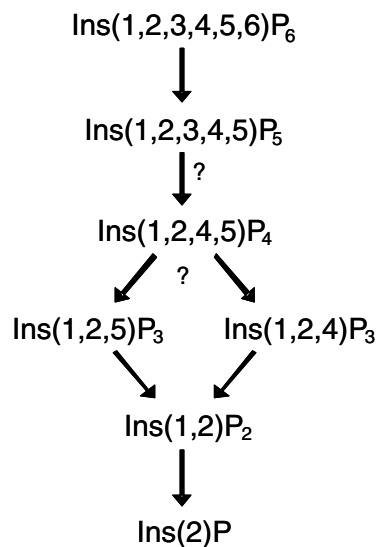
In Pelletierversuchen, die bei 60°C, 70°C und 80°C (Temperaturen gemessen im Konditionierer der Pelletierungsanlage) und einem vom Hersteller empfohlenen pH von 5,5 durchgeführt wurden, erwies sich die Phytase von *Peniophora* als mäßig hitzestabil (Igbasan et al., 2000). Nach der Pelletierung bei 60°C hatte die Phytase noch eine Aktivität von 74,5% und nach dem Pelletierungsvorgang bei 70°C bzw. 80°C noch eine Restaktivität von 66,2% bzw. 57%. Gegenüber Pepsin und Pankreatin erwies sich die *Peniophora*-Phytase als labil. Nach sechzigminütiger Inkubation in wässriger Pepsin- bzw. Pankreatin- Lösung bei 40°C hatte die Phytase nur noch 1,8% bzw. keinerlei Aktivität mehr. Igbasan et al. (2000) untersuchten ebenfalls die Stabilität der *Peniophora*-Phytase in Digesta-Überständen aus Kropf, Magen, Duodenum, Jejunum und Ileum (60 Minuten Inkubation bei 40°C). Die verbleibenden Restaktivitäten betragen 96,8% (Kropf), 59,2% (Magen), 94,8% (Duodenum), 91,1% (Jejunum) und 84,8% (Ileum).

Lassen et al. (2001) klonierten eine neue Basidiomyceten-Phytase aus *Peniophora lycii* und exprimierten sie in *Aspergillus oryzae*. Diese Phytase wurde auf ihre Eigenschaften untersucht. Das pH-Optimum liegt bei pH 4,0 - 4,5, die optimale Temperatur für die katalytische Aktivität bei 50 - 55°C. Die Restaktivität der *Peniophora*-Phytase nach

sechzigminütiger Inkubation bei pH 5,5 in 0,1 M Natriumacetat bei 80°C betrug 62%. Die *Peniophora*-Phytase enthält das Aminosäuresequenzmotiv RHGXRXP, kann also zu den sauren Histidin-Phosphatasen gezählt werden (Lassen et al., 2001).

Der Weg des Phytatabbaus wurde durch die HPLC-Analyse nachvollzogen. Bei diesem Vorgang wurde eine begrenzte Menge an Phytat (0,2 mM) als Substrat eingesetzt und die Analyse wurde bei pH 5,0 durchgeführt (Lassen et al., 2001). Die Wissenschaftler beobachteten einen schnelle Rückgang von *myo*-Inositol-Hexakisphosphat und somit einen ebenso schnellen Zuwachs an Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>. Somit ist die *Peniophora*-Phytase zu den 6-Phytasen zu zählen. Nach 60 Minuten waren 60% des Gesamt-Inositols *myo*-Inositol-Bisphosphat. Bei verlängerter Inkubation steigt das Ins(1,2)P<sub>2</sub> rasch an und erreicht nach 5 Stunden einen Höhepunkt. Ins(1,2)P<sub>2</sub> stellt dann etwa zwei Drittel des Gesamt-Inositols dar (Lassen et al., 2001). Im Anschluss entsteht Ins(2)P als Endprodukt. Der Abbauweg der *Peniophora*-Phytase ist in Abbildung 9 gezeigt.

Abbauweg der *Peniophora*-Phytase



? = Diese Schritte **nicht** durch Literatur belegt

Abbildung 9: Abbauweg der *Peniophora*-Phytase (6-Phytase) (Lassen et al., 2001)

### 2.3.3.3 *Penicillium*-Phytase

Tseng et al. (2000) isolierten und charakterisierten eine extrazelluläre 3-Phytase aus *Penicillium simplicissimum*. Aus den mehreren hundert Isolaten, die die Autoren untersuchten, zeigten nur wenige eine Aktivität von mehr als 1 U/ml. Das aktivste pilzliche Isolat mit Phytaseaktivität war *Penicillium simplicissimum* der Art W46.

Nach fünftägiger Inkubation in einem flüssigen Medium zur Phytaseproduktion (IMP) hatte das W46- Isolat 3,8 U/ml erreicht. Das rohe Enzymfiltrat wurde mittels Ultrafiltration gereinigt und das Molekulargewicht des gereinigten Enzyms wurde mit Hilfe der SDS-PAGE auf 65 kDa bestimmt.

Es handelt sich bei dieser Phytase um ein monomeres Glykoprotein. Der isoelektrische Punkt des *Penicillium*-Enzyms lag bei pH 5,8, das pH-Optimum bei pH 4,0 und die optimale Temperatur bei 55°C. Die *Penicillium*-Phytase ist inaktiv bei Werten > pH 7,5, jedoch war das Enzym sieben Tage lang stabil bei Werten zwischen pH 3,5 und 6,0. Bei pH 5,5 hatte die *Penicillium*-Phytase noch etwa 60% Aktivität und bei pH 7,0 noch etwa 50%. Das Temperaturverhalten wurde ebenfalls von Tseng et al. (2000) untersucht. Bei Temperaturen ab 60°C und höher zeigte das Enzym einen starken Abfall der Aktivität. Bei 80°C betrug die Restaktivität noch etwa 30%. Durch Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> und Zn<sup>2+</sup> wurde die Phytase stark gehemmt: Die Restaktivitäten nach etwa einstündiger Inkubation im flüssigen Medium betragen 89%, 60% und 62%. Die *Penicillium simplicissimum*-Phytase zeigte eine breite Spezifität gegenüber verschiedenen phosphorhaltigen Substraten, gegenüber Phytat eine Spezifität von 100%. Dies bedeutet, dass das Enzym zwar viele phosphorhaltige Substrate binden und spalten kann, Phytat jedoch das Substrat ist, welches am besten in das aktive Zentrum passt und somit von der *Penicillium simplicissimum*-Phytase nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip vorrangig gebunden wird.

### 2.3.4 Bakterielle Phytasen

#### 2.3.4.1 *Klebsiella*-Phytase

Die *Klebsiella*-Phytase ist eine mikrobielle 3-Phytase, sie hydrolisiert demnach zuerst die Phosphatgruppe am dritten C-Atom des Phytats.

Die Phytase von *Klebsiella* sp. ASR1 hat ein Molekulargewicht von 42 kDa (Sajidan et al., 2004), die *Klebsiella terrigena*-Phytase nur von 40 kDa (Greiner et al., 1997). Bei letzterer Phytase handelt es sich um ein zytoplasmatisches, monomeres Protein (Greiner et al., 1997). Das phyK-Gen der *Klebsiella* sp. ASR1 für die ASR1-Phytase wurde exprimiert in *Escherichia coli* (Sajidan et al., 2004). Das Gen für die *Klebsiella terrigena*-Phytase stammt ebenfalls aus diesem *Klebsiella*-Stamm und wurde auch in diesem exprimiert.

Das pH-Optimum dieser beiden Phytasen liegt bei pH 5,0 (Greiner et al., 1997; Sajidan et al., 2004). Die Phytase *Klebsiella* ASR1 wird inaktiv bei Werten > pH 7 und < pH 4 (Sajidan et al., 2004), die *Klebsiella terrigena*-Phytase ist erst inaktiv bei pH-Werten > 7,5 (Greiner et al., 1997).

Die Phytase von *Klebsiella* sp. ASR1 hat ihr Temperaturoptimum im Bereich zwischen 45- 50°C (Sajidan et al., 2004). Für die *Klebsiella terrigena*-Phytase fanden Greiner et al. (1997) eine optimale Temperatur zum Phytatabbau bei 58°C.

Sowohl die ASR1-Phytase als auch die Phytase von *Klebsiella terrigena* weisen eine schlechte Temperaturstabilität auf. Sajidan et al. (2004) bestimmten das Temperaturprofil der *Klebsiella*-Phytase in einem Bereich von 4°C bis 70°C, in dem sie die Standard-Phytase-Untersuchung durchführten. Die Enzymaktivität nahm mit steigender Temperatur bis 45°C zu und nahm bei über 50°C ab. Die *Klebsiella*-Phytase war stabil bei fünfzehnminütiger Inkubation bei Temperaturen von 0 - 45°C, allerdings nahm die Aktivität bei 55 - 60°C signifikant ab. Nach Inkubation bei 60°C war keine Aktivität mehr feststellbar. Greiner et al. (1997) stellten das Temperaturprofil für die Stabilitätsmessung der *Klebsiella terrigena*-Phytase bei Temperaturen von 10°C bis 80°C ebenfalls unter Durchführung der Standard-Phytase-Untersuchung her. Während die Temperatur bis auf 55°C anstieg, wurde kein weiterer Anstieg der Phytaseaktivität beobachtet. Bei Temperaturen über 55°C trat ein Aktivitätsverlust ein und es kam zu einer sehr starken Abnahme der Aktivität bei 60°C.

Elkhalil et al. (2004) stellten eine *Klebsiella*-Phytase her, wie bei Sajidan et al. (2004) beschrieben, und untersuchten die biochemischen Eigenschaften dieser Phytase, wie bei Igbasan et al. (2000) dargestellt. Die Autoren fanden heraus, dass die *Klebsiella*-Phytase eine gute proteolytische Stabilität aufweist. Nach sechzigminütiger Inkubation bei 40°C in Lösungen aus Digestaüberständen aus Magen bzw. Duodenum und in Lösungen, die mit den porcinen Proteasen Pepsin und Pankreatin versetzt waren, wies die Phytase noch 96,8%, 96,3%, 86,7% und 94,8% Restaktivität auf.

Eine weitere Eigenschaft, die als positiv zu bewerten ist, ist die Phytatspezifität des *Klebsiella terrigena*-Enzyms unter physiologischen Bedingungen (Greiner et al., 1997) und die Tatsache, dass Phytat bevorzugtes Substrat der ASR1-Phytase ist (Sajidan et al., 2004). Die ASR1-Phytase baut als weitere Substrate NADP und Zuckerphosphate ab (Sajidan et al., 2004).

Die Aminosäuresequenz des reifen Proteins der *Klebsiella* sp. ASR1-Phytase enthält das Sequenzmotiv RHGXRXRP, wie auch die anderen Histidinphosphatasen. Greiner et al. (1997) fanden als potenteste Inhibitoren für das *Klebsiella terrigena*-Enzym Kupfer, Zink, Fluorid, Molybdat, Vanadat und Phosphat. Die Autoren konnten außerdem den Weg des Phytatabbaus der *Klebsiella terrigena*-Phytase durch Trennung der Hydrolyseprodukte durch die HPLC nachvollziehen. Sie konnten aufzeigen, dass IP6 schrittweise abgebaut wird und dabei IP5 nur ein kurzlebige Zwischenprodukt darstellt. IP3 wurde weniger schnell hydrolysiert als IP4. IP3 war deshalb das erste Hydrolyseprodukt, das während des Abbauprozesses akkumulierte. Das Pentakisphosphat wurde als Ins(1,2,4,5,6)P5 und das Tetrakisphosphat als Ins(1,2,5,6)P4 identifiziert.

Sajidan et al. (2004) untersuchten den Weg des Phytatabbaus der *Klebsiella* ASR1-Phytase (Abbildung 10). Sie identifizierten die enzymatischen Hydrolyseprodukte ebenfalls durch die HPLC. Die schrittweise Dephosphorylierung von Phytat durch die ASR1-Phytase erfolgt zunächst über Abspaltung des Phosphats an Position drei. Es entsteht Ins(1,2,4,5,6)P5. Für den weiteren Verlauf des Phytatabbaus stellten die Wissenschaftler zwei unabhängige Wege fest. Bei dem einen Weg wird im zweiten Schritt die Phosphatgruppe in erster Position abgespalten, so dass Ins(2,4,5,6)P4 entsteht. Weiterhin werden die Phosphatgruppe in sechster und dann die in fünfter Position dephosphoryliert. Nacheinander entstehen somit als Zwischenprodukte Ins(2,4,5)P3 und Ins(2,4)P2. Beim zweiten möglichen

Dephosphorilierungsweg werden im zweiten Schritt die vierte Phosphatgruppe, im dritten Schritt die fünfte und im vierten Schritt die Phosphatgruppe in Position sechs abgespalten. Die Zwischenprodukte sind hier also Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> und Ins(1,2)P<sub>2</sub>. Im letzten Schritt entsteht bei beiden Wegen durch Abspaltung des Phosphats am vierten bzw. ersten C-Atom das Endprodukt Ins(2)P.

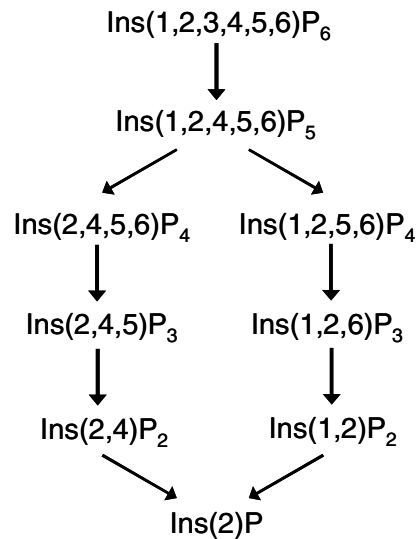


Abbildung 10: Abbauwege der *Klebsiella*-Phytase (3-Phytase) (Sajidan et al., 2004)

#### 2.3.4.2 *E.coli*-Phytase

Bei der Phytase von *E.coli* handelt es sich um eine bakterielle 6-Phytase. Der optimale pH-Wert für diese Phytase liegt bei 4,5 (Igbasan et al., 2000; Garrett et al., 2004). Rodriguez et al. (1999) produzierten allerdings eine *E.coli*-Phytase und -Phosphatase mit dem *E.coli* saure Phosphatase-Gen appA2 bzw. appA vom Schwein in der Hefe *Pichia pastoris*. Bei diesem Produkt liegt der optimale pH-Wert bei 2,5 bis 3,5 und das Molekulargewicht dieser appA-Phytase beträgt 46,3 kDa. Die *E.coli*-Phytase ist ab pH 7,0 inaktiv und das Temperaturoptimum für diese Phytase liegt bei 60°C (Igbasan et al., 2000) bzw. für die appA- und appA2-Phytase bei 55°C (Rodriguez et al., 1999).

Da die meisten Broiler- und Schweinediäten pelletiert werden, ist es vor der Supplementierung von Enzymen wichtig zu untersuchen, ob diese den relativ hohen Temperaturen beim Pelletierungsprozess standhalten, d.h. ob sie ihre Aktivität beibehalten. In Pelletierungsversuchen wiesen Igbasan et al. (2000) nach, dass die *E.coli*-Phytase nach dem Pelletierungsprozess bei 60°C noch 98,8% der ursprünglichen Aktivität aufweist, nach Pelletierung bei 70°C noch 78% und nach Pelletierung bei 80°C noch 24,4% Restaktivität hat. Diese Versuche zeigen, dass die Phytase von *E.coli* eine gute Temperaturstabilität aufweist. Die Temperaturen wurden bei diesem Versuch im Konditionierer der Pelletierungsanlage gemessen. Rodriguez et al. (1999) zeigten allerdings, dass die Phytase appA2 bei Temperaturen von 65 - 80°C seine Aktivität zum größten Teil verliert.

Eine weitere positive Eigenschaft der *E.coli*-Phytase ist die gute proteolytische Stabilität. Nach einer Stunde Inkubation bei 40°C mit Pankreatin-Lösung zum einen und mit Pepsin-

Lösung zum anderen zeigte die Phytase noch 95,9% bzw. 94,6% ihrer Aktivität (Igbasan et al., 2000).

Die Stabilität in Digesta-Überständen aus verschiedenen Teilen des Verdauungstraktes von Hennen wurde ebenfalls von Igbasan et al. (2000) untersucht: Nach sechzigminütiger Inkubation bei 40°C in Überstands-Lösungen aus Kropf, Magen, Duodenum, Jejunum und Ileum hatte die *E.coli*-Phytase jeweils noch eine Restaktivität von 96,9%, 92,8%, 96,8%, 86,7% und 80,4%.

Rodriguez et al. (1999) stellten fest, dass die appA- bzw. appA2-Phytase eine höhere Spezifität für das Substrat Natriumphytat als für Nitrophenyl-Phosphat hat.

Der Abbau von Phytat durch das Enzym P2 von *E.coli* geht folgendermaßen vor sich (Greiner et al., 2000) (Abbildung 11): Zunächst wird die Phosphatgruppe am sechsten C-Atom abgespalten, da es sich bei der *E.coli*-Phytase um eine 6-Phytase handelt. Es entsteht Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub>. Im zweiten Schritt wird die erste Phosphorgruppe abgespalten und das Zwischenprodukt ist Ins(2,3,4,5)P<sub>4</sub>. Daraufhin werden nacheinander die dritte und dann die vierte Phosphatgruppe vom *myo*-Inositolring abgespalten, so dass zuerst Ins(2,4,5)P<sub>3</sub> und dann Ins(2,5)P<sub>2</sub> entstehen. Im letzten Schritt wird die fünfte Phosphatgruppe dephosphoryliert. Das Endprodukt der P2-Phytase von *E.coli* ist demnach Ins(2)P.

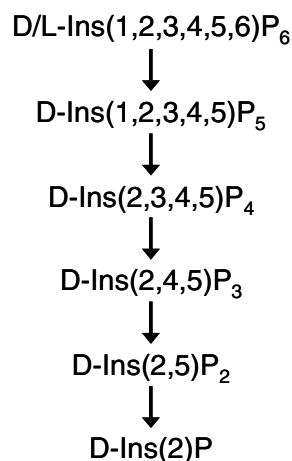


Abbildung 11: Abbauweg der *E. coli*-Phytase P2 (6-Phytase) (Greiner et al., 2000)

### 2.3.4.3 *Bacillus*-Phytase

Die Phytase von *Bacillus* stellt eine Ausnahme unter den mikrobiellen Phytasen dar. *Bacillus*-Phytasen haben weder eine Sequenzhomologie zu anderen Phytasen noch zu Phosphatasen, sie besitzen nicht das Sequenzmotiv des aktiven Zentrums RHGXRRP und außerdem unterscheiden sich die biochemischen und biophysischen Charakteristika von denen gut charakterisierter pilzlicher Phytasen (Kerovuo et al., 2000a). Die Aktivität der *Bacillus*-Phytase ist teilweise abhängig von Metallionen, und eine solche Abhängigkeit ist für keine andere Phytase berichtet worden. Auch diese Tatsache stellt also eine Ausnahme dar. Da das Sequenzmotiv RHGXRRP des aktiven Zentrums der sauren Histidin-Phosphatasen bei der *Bacillus*-Phytase nicht nachweisbar ist, lässt sich schließen, dass die Phytase aus *Bacillus* nicht zur Subfamilie der sauren Histidin-Phosphatasen gehört, sondern vielmehr ein neues Enzym mit Phytaseaktivität ist (Kerovuo et al., 1998).



Es handelt sich bei der *Bacillus*-Phytase um eine 3-Phytase (Igbasan et al., 2000), wobei Kerovuo et al. (2000b) eine *PhyC*-Gen-Phytase entdeckten, welche die Eigenschaften einer 3- und einer 6-Phytase hat.

Das Phytasegen wurde von einem *Bacillus subtilis*-Wildstamm produziert (Igbasan et al., 2000; Simon und Igbasan, 2002).

Kerovuo et al. (1998) isolierten das *phyC*-Phytase-Gen für eine neue *Bacillus*-Phytase *PhyC* aus dem *Bacillus subtilis*-Stamm VTT E-68013. Diese *Bacillus*-Phytase besitzt ein Molekulargewicht von 43 kDa. Das Enzym weist im Gegensatz zu allen pilzlichen und den anderen bakteriellen Phytasen das pH-Optimum nicht im sauren Bereich auf, sondern bei pH 7,0. Dies ist eine Besonderheit, denn somit zeigt die *Bacillus*-Phytase bei neutralem pH-Wert die größte Aktivität. Auch ab pH 5,0 ist die Phytase aktiv und die Aktivität nimmt mit steigendem pH bis hin zum Optimum bei pH 7,0 zu. Daher kann die *Bacillus*-Phytase bei Anwesenheit von Futtermitteln im Magen, wenn also ein pH von 4,0 bis 5,0 vorliegt, bereits aktiv sein. Bei pH 5,5 bis 7,5 wurde eine Aktivität von wenigstens 70% nachgewiesen (Igbasan et al., 2000).

Außer in der Magenregion des Geflügels und im Schweinemagen liegt der pH-Wert im Gastrointestinaltrakt dieser Tiere zwischen pH 5,0 und pH 7,0. Das bedeutet, dass die *Bacillus*-Phytase besonders gut in der postgastrischen Region des Magen-Darm-Traktes wirksam sein kann.

Eine weitere Besonderheit der *Bacillus*-Phytase ist die hohe Substratspezifität. Das Enzym baut Phytat mit einer Spezifität von 100%, ADP mit 75% und ATP mit einer Spezifität von 50% ab (Kerovuo et al., 1998). Die hohe Phytat-Spezifität ist ein weiterer Grund dafür, dass die *Bacillus*-Phytase für die Supplementierung zu Futtermitteln für monogastrische Nutztiere so interessant ist.

Weiterhin ist festzuhalten, dass die optimale Temperatur für die Phytase von *Bacillus subtilis* bei 50- 60°C liegt (Kerovuo et al., 1998; Igbasan et al., 2000). Es ist anzumerken, dass das recht hohe Temperaturoptimum zur Folge hat, dass die *Bacillus*-Phytase bei der Körpertemperatur von Tieren, also bei etwa 38°C, nur zwischen 40% und 60% ihrer maximalen Phytaseaktivität aufbringen kann (Igbasan et al., 2000).

Die *Bacillus*-Phytase hat eine hohe Temperaturstabilität, welche allerdings von der Anwesenheit von Calcium abhängig ist (Kerovuo et al., 2000a; Simon und Igbasan, 2002). Calcium hat einen starken Stabilisierungs-Effekt gegen Hitzedenaturierung auf das Enzym (Kerovuo et al., 2000a). Das *PhyC*-Enzym behielt nach zehnminütiger Inkubation bei 60°C in der Anwesenheit von 5 mM Calcium noch 90% seiner Aktivität, während ohne Calciumionen keine Aktivität nach zehn Minuten mehr festgestellt wurde (Kerovuo et al., 2000a). Nach zehnminütiger Inkubation bei 100°C in der Gegenwart von Calcium zeigte das *Bacillus*-Enzym immer noch eine Restaktivität von 20%. Igbasan und Kollegen (2000) konnten feststellen, dass bei zwanzigminütiger Inkubation bei 60°C in wässriger Lösung die Phytase völlig stabil war und nach 20 min bei 70°C noch etwa 60% ihrer Aktivität hatte.

Die *Bacillus*-Phytase zeigt eine hohe proteolytische Stabilität gegenüber Pankreatin. Nach sechzigminütiger Inkubation des Enzyms bei 40°C mit Pankreatin-Lösung hatte die *Bacillus*-Phytase noch immer eine Restaktivität von 91,1%. Gegenüber Pepsin ist die proteolytische Stabilität nicht sehr hoch: Nach 60 Minuten Inkubation bei 40°C in einer Pepsin-Lösung hatte die *Bacillus*-Phytase nur noch eine Restaktivität von 19,3% (Igbasan et al., 2000).

Igbasan et al. (2000) untersuchten für die *Bacillus*-Phytase auch die Stabilität in Digesta-Überständen. Die Überstände aus Kropf, Magen, Duodenum, Jejunum und Ileum wurden in Wasser gelöst und dann für 60 Minuten bei 40°C mit der *Bacillus*-Enzym-Lösung inkubiert. Die verbleibende Restaktivität des Enzyms wurde nach 60 Minuten gemessen. Sie betrug 93,5% (Kropf), 70,8% (Magen), 95,3% (Duodenum), 91,5% (Jejunum) und 97,3% (Ileum). Diese Werte zeigen deutlich, dass die *Bacillus*-Phytase bei dem pH von Digesta aus dem Magen am meisten Aktivität verliert.

Die Autoren Kim et al. (1998) isolierten aus dem Schmutz eines koreanischen Viehstalles eine thermostabile *Bacillus*-Phytase. Das Gen stammt aus dem *Bacillus amyloliquefaciens*-Isolat DS11, Produktionsorganismus war *Bacillus subtilis* DB104. Die Autoren untersuchten biochemischen Eigenschaften dieser Phytase. Es zeigte sich, dass *Bacillus* DS11 eine Variante von *Bacillus alvei* ist. Das Molekulargewicht der DS11-Phytase beträgt 44kDa. Kim et al. (1998) bestimmten die N-terminale Aminosäuresequenz, sie lautet: Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr-Val-Asn-Ala-Ala-X-Glu-Thr. Sie unterscheidet sich deutlich von den Sequenzen der *E.coli*- und *Aspergillus*-Phytasen, worin die Autoren einen weiteren Hinweis darauf sehen, dass es sich bei der *Bacillus* DS11-Phytase um eine neue Phytase handelt.

Das Gen von *Bacillus amyloliquefaciens* umfasst 1152 Nukleotide und kodiert für ein Polypeptid aus 383 Aminosäuren, die Signalsequenz eingeschlossen (Ha et al., 1999). Diese reduzierte Anzahl von 383 Aminosäuren steht im Gegensatz zu etwa 450 Aminosäuren, für die die pilzlichen Phytasen kodieren. Das DS11-Enzym enthält nicht das Aminosäuresequenzmotiv RHGX RXP, weist ein pH-Optimum bei pH 7,0 auf und ist zwischen pH 4,0 und pH 8,0 völlig stabil. Bei Anwesenheit von 5 mM Calciumchlorid ist das DS11-Enzym im Bereich von pH 3,0- 12,0 stabil. Das Temperaturoptimum für die katalytische Aktivität liegt bei 70°C.

Kim et al. (1998) untersuchten die Thermostabilität, indem sie die Aktivität der DS11-Phytase nach zehnminütiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen maßen. Die Stabilität der DS11-Phytase war drastisch reduziert bei Temperaturen über 50°C in Abwesenheit von Calciumchlorid, während es in Anwesenheit von 5mM Calciumchlorid bis 90°C stabil war. Nach zehnminütiger Inkubation bei 90°C lag die verbleibende Aktivität noch bei 50% der Ausgangsaktivität. Ausgedrückt in der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  hatte DS11 nach der Inkubation bei 80°C eine Halbwertszeit von 42 Minuten und nach Inkubation im wässrigen Medium bei 90°C eine  $t_{1/2}$  von zehn Minuten (Kim et al., 1999).

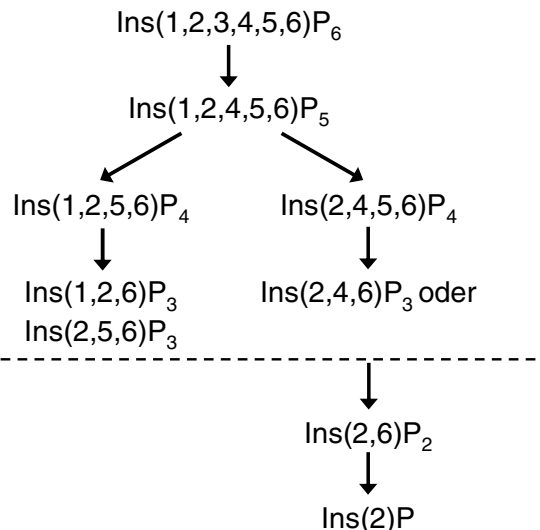
Die Autoren verglichen auch die Aminosäurezusammensetzung des Enzyms von *Bacillus* DS11 und verglichen es mit der der *Bacillus subtilis*-Phytase. Die Anzahl jeder Aminosäure wurde auf der Basis ihres Molekulargewichtes berechnet. Zwischen den beiden Enzymen bestehen große Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäuren. Die Ergebnisse dieses Vergleiches zeigen deutlich, dass die *Bacillus*-Phytasen *Bacillus* DS11 und *Bacillus subtilis* unterschiedliche Enzyme sind, abgesehen von Ähnlichkeiten des Molekulargewichts und ähnlichen physiochemischen Stabilitäten (Kim et al., 1998).

In einigen Veröffentlichungen wurden nicht nur die Eigenschaften der Phytasen untersucht, sondern auch der Weg des Phytatabbaus. Greiner et al. (2002a) fanden den Weg des Abbaus von Phytat durch *Bacillus subtilis* 168, *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 15841 und *Bacillus amyloliquefaciens* 45. Die Identifizierung der Isomere erfolgte mit Hilfe der HPLC. Die Autoren beschreiben folgenden Weg des Phytatabbaus (Abbildung 12):

Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub> wird durch die 3-Phytase an der Phosphatgruppe in Position drei angegriffen und dieses Phosphat wird zuerst abgespalten. Es entsteht Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>. Im Folgenden gibt es zwei unterschiedliche Wege. Entweder wird das Phosphat in erster oder vierter Position als nächstes abgespalten und es entsteht Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> bzw. Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub>. Von diesen beiden Zwischenprodukten ausgehend gibt es zwei Wege der hydrolytischen Spaltung: Von Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub> wird entweder die fünfte oder die vierte Phosphatgruppe abgespalten, so dass bei diesem Weg Ins(2,4,6)P<sub>3</sub> bzw. Ins(2,5,6)P<sub>3</sub> die Endprodukte sind. Bei Ins(1,2,5,6)P<sub>4</sub> erfolgt der nächste Angriff an der fünften Phosphatgruppe. Das Endprodukt ist bei diesem Weg demnach Ins(1,2,6)P<sub>3</sub>.

Im Experiment entdeckten Greiner et al. (2002a), dass Ins(2,4,6)P<sub>3</sub>, Ins(2,5,6)P<sub>3</sub> und Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> die Hauptendprodukte bei der hydrolytischen Spaltung durch die drei untersuchten *Bacillus*-Arten sind. Bei längerer Inkubation des Substrats Phytat mit höheren Enzymkonzentrationen findet jedoch eine weitere Spaltung des Produktes Ins(1,2,6)P<sub>3</sub> in Ins(2,6)P<sub>2</sub> und schließlich bis hin zu Ins(2)P statt.

*Bacillus*-Phytase (3-Phytase):  
*Bac. subtilis* 168,  
*Bac. amyloliquefaciens* ATCC 15841  
*Bac. amyloliquefaciens* 45  
 (Lit.: Greiner et al. 2002)



Hauptendprodukte = InsP<sub>3</sub>;  
**Nur** bei verlängerter Inkubation  
 mit höheren Enzymkonzentrationen  
 weiterer Abbau

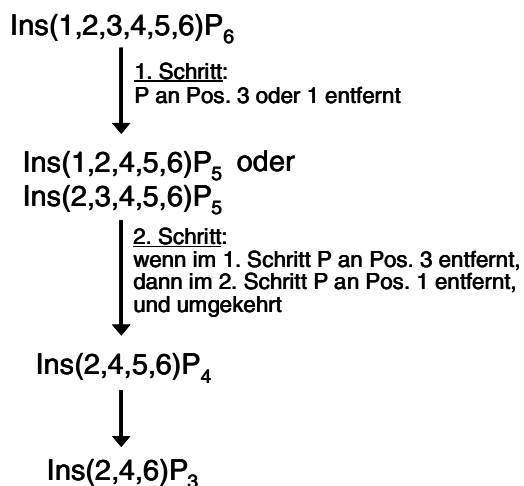
Abbildung 12: Abbauweg der *Bacillus*-Phytase (3-Phytase) (Greiner et al., 2002a)

Kerovuo et al. (2000b) entdeckten, dass die *Bacillus*-Phytase *PhyC* sowohl 3- als auch 6-Phytase-Eigenschaften besitzt. Allerdings geht die Phytase bei der Spaltung des Phytats immer nur nach einem der Wege vor, spaltet also nicht in ein- und demselben Phytatmolekül an der dritten und sechsten Position Phosphat ab (Kerovuo et al., 2000b).

Bei dem 3-Phytase-Abbauweg (Abbildung 13) wird zuerst das Phosphat an dritter Position abgespalten, so dass Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> entsteht. Möglich ist aber auch die Abspaltung vom Phosphat an erster Stelle, so dass auch Ins(2,3,4,5,6)P<sub>5</sub> entstehen kann. Welches Phosphat zuerst abgespalten wird, ist den Autoren aus ihren Daten nicht ersichtlich. Je nachdem, welches Phosphat im ersten Schritt abgespalten wurde, wird im zweiten Schritt das dritte bzw. das fünfte Phosphat abgespalten. Das Produkt dieses Schrittes ist in jedem Falle Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub>. Durch die 3-Phytase von *Bacillus PhyC* entsteht als Endprodukt durch Abspalten des Phosphats an fünfter Position Ins(2,4,6)P<sub>3</sub>.

Der Weg der 6-Phytase sieht folgendermaßen aus (Abbildung 13): Zunächst wird vom  $\text{Ins}(1,2,3,4,5,6)\text{P}_6$  das Phosphat in sechster *oder* vierter Position abgespalten. Die Zwischenprodukte  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,3,5,6)\text{P}_5$  können die Autoren ebenfalls nicht unterscheiden. Allerdings kommt es in diesem Fall nicht zu einer Akkumulation der beiden Isomere. Hieraus kann man schlussfolgern, dass das  $\text{InsP}_5$  wohl an das Enzym gebunden bleibt und gleich weiter gespalten wird. Im zweiten Schritt spaltet das Enzym die vierte bzw. sechste Phosphatgruppe ab, je nachdem, welche im ersten Schritt hydrolysiert wurde. Das Produkt ist in beiden Fällen  $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$ . Zuletzt spaltet die 6-Phytase von *Bacillus PhyC* das zweite Phosphat ab. Das Endprodukt ist  $\text{Ins}(1,3,5)\text{P}_3$ .

#### Weg der 3-Phytase



#### Weg der 6-Phytase

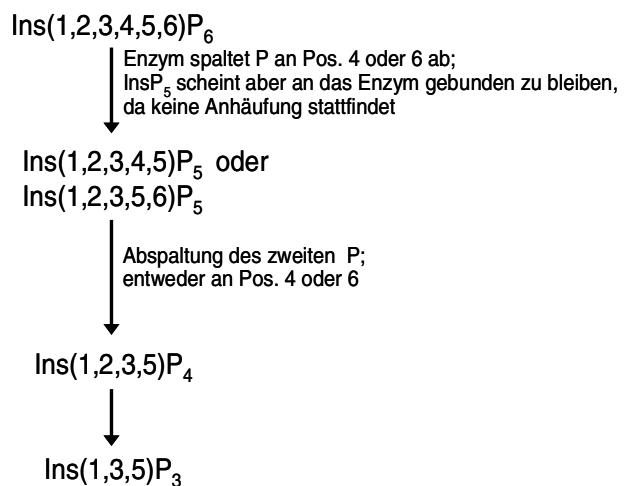


Abbildung 13: Abbauwege der *Bacillus*-Phytase PhyC (3- und 6-Phytase) (Kerovuo et al., 2000b)

#### 2.3.4.4 *Lactobacillus*-Phytase

Zamudio et al. (2001) evaluierten die Phytaseaktivität von sechs verschiedenen Milchsäurebakterien. Alle sechs Milchsäurebakterien zeigten nur eine geringe Phytaseaktivität, die höchste Aktivität unter ihnen wurde jedoch mit 6,3 mU ml<sup>-1</sup> für die *Lactobacillus plantarum*-Phytase gemessen. Die Phytase von *Lactobacillus plantarum* wurde durch Gelfiltration aus dem Überstand der Kultur teilweise gereinigt. Die Phytase hat ein Molekulargewicht von 52 kDa, eine optimale Aktivität bei pH 5,5 und 65°C und eine sehr geringe Spezifität für Phytat verglichen mit Monophosphateestern (Zamudio et al., 2001). Im sauren pH-Bereich von pH 2,5- 3,5 sowie bei pH 6,5 ist die *Lactobacillus plantarum*-Phytase nahezu inaktiv, ebenso nimmt die Phytaseaktivität im flüssigen Medium bei Temperaturen > 70°C stark ab.

De Angelis et al. (2003) untersuchten zwölf Arten von Sauerteigbakterien auf ihre Phytaseaktivität. Die höchste Aktivität zeigte die Spezies und der Stamm *Lactobacillus safranciscensis* mit 420,8 U/ml Enzymaktivität. Gemessen wurde die Phytaseaktivität nach zweistündiger Inkubation bei 40°C in einem wässrigen Medium mit 3 mM Natriumphytat (De Angelis et al., 2003). Es wurde eine 50 kDa- Phytase aus *Lactobacillus safranciscensis* CB1 in drei chromatographischen Schritten gereinigt. Die *Lactobacillus*-Phytase zeigte bei einem pH von 4,0 und einer Temperatur von 45°C optimale Aktivität. Die höchste Substratspezifität

mit der höchsten Hydrolyserate zeigte die Phytase für Adenosin-5'-tri-, di- und monophosphat. Verglichen mit diesen Substraten war Natriumphytat ebenso relevant. Das *Lactobacillus*-Enzym war nach 30 Minuten Inkubation bei 70°C im wässrigen Medium hitzestabil.

## 2.3.5 Gentechnisch modifizierte Phytasen

### 2.3.5.1 *Consensus*-Phytase

Die *Consensus*-Phytase-1 ist ein biosynthetisches Enzym. Lehmann et al.(2000) kalkulierten die *Consensus*-Aminosäuresequenz aus 13 homologen pilzlichen Phytasen, die aus drei *Aspergillus niger*-Isolaten, zwei Isolaten von *Aspergillus terreus*, fünf *Aspergillus fumigatus*-Isolaten und je einem Isolat von dem Ascomyceten *Emericella nidulans* und *Talaromyces thermophilus* bestand. Diese Sequenzen wurden dann aufgereiht, um das biosynthetische Enzym herzustellen. Diese Phytase erwies sich als sehr thermostabil: Nach dem Pelletierungsvorgang bei 60°C, 70°C und 80°C (Temperaturen im Konditionierer der Pelletierungsanlage gemessen) hatte die *Consensus*-Phytase noch ihre vollständige Aktivität (Simon und Igbasan, 2002). Lehmann et al.(2000) geben als Temperatur, bei der sich das Enzym entfaltet und denaturiert mit 78°C an.

Die *Consensus*-Phytase-1 zeigte mit 78°C eine um 15 - 22°C höhere Entfaltungstemperatur als alle Eltern-Phytasen, die für den Entwurf der *Consensus*-Phytase-1 genutzt wurden (Lehmann et al., 2000). Die für die *Consensus*-Phytase optimale Temperatur wurde bei 71°C gefunden (Simon und Igbasan, 2002; Gentile et al., 2003). Bemerkenswerterweise ist bei der *Consensus*-Phytase trotz des Zuwachses an Thermostabilität eine katalytische Aktivität bei 37°C nicht gefährdet (Lehmann et al., 2000).

Das pH-Optimum für die experimentelle Phytase („experimental consensus phytase SP 1002“, Roche Vitamins Limited) liegt laut Simon und Igbasan (2002) bei 4,5- 5,5, wie bei den pilzlichen Phytasen, bei pH 7 ist das Enzym inaktiv. Gentile et al. (2003) fanden ein Optimum bei pH 6,5 (bei einer Temperatur von 37°C).

Die katalytischen Fähigkeiten der *Consensus*-Phytase-1 ähnelten am meisten denen von *Emericella nidulans* und *Aspergillus fumigatus* (Lehmann et al., 2002).

Lehmann et al. (2002) kalkulierten zwei weitere *Consensus*-Phytasen (*Consensus*-Phytase-10 und -11): Sie fügten sechs weitere pilzlichen Phytase-Sequenzen in die Aminosäuresequenz der neuen *Consensus*-Phytasen-10 und -11 ein. Im Falle der *Consensus*-Phytase-10 wurden zwei Sequenzen addiert: Zum einen die Phytase-Sequenz des Ascomyceten *Thermomyces lanuginosus* und zum anderen die Conbasidio-Phytase-Sequenz, welche selbst eine *Consensus*-Sequenz der Basidiomyceten *Peniophora lycii*, *Trametes pubescens*, *Agrocybe pediades* und *cf. Ceriporia* darstellt (Lehmann et al., 2002). Es wurden von diesen vier Basidiomyceten fünf Phytase-Sequenzen hinzugefügt (Lehmann et al., 2002). Die endgültige *Consensus*-Phytase-10 unterscheidet sich von der *Consensus*-Phytase-1 in 32 Aminosäureresten (Lehmann et al., 2002). Die *Consensus*-Phytase-10 war um 7,4°C thermostabiler als die *Consensus*-Phytase-1 und die Entfaltungs-Temperatur (Hitzenaturierung) konnte nochmals auf 85,4°C verbessert werden. Das

Temperaturoptimum lag für die *Consensus*-Phytase-10 um 9°C höher als bei *Consensus*-1, also bei 80°C (Lehmann et al., 2002).

Für die *Consensus*-Phytase-11 sind keine Daten über die Thermostabilität erhältlich, da es sich bei dieser Phytase um ein theoretisches Konstrukt handelt (Lehmann et al., 2002).

Die proteolytische Stabilität der experimentellen *Consensus*-Phytase wurde von Simon et al. (2002) nach 45 Minuten Inkubation bei 40°C in einer Lösung mit porcinen Proteasen gemessen. Nach Inkubation mit Pepsin zeigte die *Consensus*-Phytase noch 85,3% Aktivität, nach Inkubation mit Pankreatin sogar noch 95,8%. Auch die Messung der Residualaktivität nach einstündiger Inkubation bei 40°C mit Lösungen aus Digesta-Überständen verschiedener Segmente des Gastrointestinaltraktes von Hennen wurde im Falle der *Consensus*-Phytase durchgeführt: Nach Inkubation mit Kropfinhalt wurde noch 91,5% der Aktivität gemessen, bei Mageninhalt noch 86,5%, nach Inkubation mit Duodenalinhalt stellten die Autoren noch 88,3% Aktivität fest, bei Jejunalinhalt 78,0% und bei Ilealinhalt 85,5% Restaktivität (Simon und Igbasan, 2002).

Männer et al. (2006) untersuchten die Effektivität der *Consensus*-Phytase für laktierende Sauen und die der *Peniophora*-Phytase in Diäten für trächtige Sauen. Im Hinblick auf die Phosphor-Verdaulichkeit des Phytat-Phosphors, also einer Steigerung der Phosphor-Verdaulichkeit, waren in dieser Studie beide Phytasen effektiv. Die *Consensus*-Phytase erzielte bei einer verabreichten Dosis von 500 Einheiten/kg Sauenfutter eine Freisetzung von 0,6g Phosphor pro kg Futter aus Phytat (Männer und Simon, 2006).

### **2.3.5.2 *E.coli*-Phytase Phy9X**

Garrett et al. (2004) veränderten in ihrer Studie die Leistung einer bakteriellen *E.coli*-Phytase mittels ortsgerechter Mutagenese (Gene Site Saturation Mutagenesis, GSSM). Ausgehend vom *appA*-Gen von *E. coli* wurden durch die GSSM 431 Varianten durch Mutation von Aminosäure-Resten erzeugt, die jeweils für alle 19 möglichen Aminosäure-Reste an den zugehörigen Sequenzpositionen kodierte. Diese Klone wurden erzeugt, um die Temperaturstabilität und die Stabilität der Phytase gegenüber den Verdauungsenzymen im Magen zu verbessern. Es entstanden 14 Varianten, die nach Erhitzung eine zehnfach höhere Restaktivität als das Wildtyp-Enzym aufwiesen (Garrett et al., 2004). Durch gezieltes und schrittweises Hinzufügen von Kombinationen einzelner Aminosäure-Reste wurde unter diesen 14 Varianten nach dem ultimativen, hitzestabilen Produkt gesucht. Die maximale Steigerung der Temperatur-Toleranz wurde erreicht durch das Hinzufügen von acht Mutationen in das Konstrukt Phy9X (Garrett et al., 2004).

Die *E. coli* Phy9X-Phytase hat ein pH-Optimum bei pH 4,5 und ist bei Werten < pH 2,5 inaktiv (Garrett et al., 2004).

Garrett et al. (2004) berichten, dass die Phy9X-Phytase eine sehr gute Temperaturstabilität aufweist: Nach einstündiger Inkubation in wässriger Pufferlösung bei 62°C lag die Aktivität des Enzyms noch bei 100%. Nach Inkubation bei 85°C und sonst gleichen Bedingungen verlor das Enzym nur 27% der Aktivität. Die Stabilität gegenüber den Bedingungen im Magen prüften Garrett et al. (2004), indem sie das Enzym in einer künstlich hergestellten Magenlösung (enthält 2 mg NaCl/ml, 84 mM HCl und 3,2 mg Pepsin/ml bei einem pH von 1,2) bei 37°C inkubierten. Die Magenstabilität, ausgedrückt in der Halbwertszeit der Aktivität,

lag für das *E.coli* Phy9X-Enzym mit 8,7 Minuten 3,5 Mal höher als die Halbwertszeit des Elternenzym (t<sub>1/2</sub> = 2,4 min). Die Halbwertszeit definierten die Autoren als die Zeit (in Minuten), in der 50% der Aktivität verloren geht, bezüglich der Aktivität, die das Enzym zu Beginn (am Zeitpunkt Null) der Verdauungsreaktion hatte (Garrett et al., 2004).

### 2.4 Schlussfolgerungen aus der Literaturübersicht

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle beschriebenen Phytasen gewisse Vor- und Nachteile aufweisen:

Die pflanzlichen Phytasen kommen in z.T. beträchtlichen Konzentrationen in Pflanzen vor, wie z.B. in Roggen mit 5130 FTU/kg und in Weizenkleie mit 2975 FTU/kg. Zusätzlich haben die pflanzlichen Phytasen den Vorteil, dass sie Phytat sehr effektiv abbauen, nämlich bis zum Inositol-Monophosphat bzw. sogar bis zum *myo*-Inositol.

Das pH-Optimum der pflanzlichen Phytasen liegt im sauren Bereich, was bedeutet, dass ihr Hauptwirkungsort im Organismus der Magen wäre. Die Roggen- und Mais-Phytasen weisen auch im neutralen pH eine gewisse Aktivität auf, so dass die Möglichkeit bestünde, dass diese Phytasen ebenso im Dünndarm noch aktiv wären. Pflanzliche Phytasen scheinen aufgrund der dargestellten positiven Eigenschaften sehr interessante Kandidaten für die Verbesserung der Phytat-Phosphor-Verfügbarkeit bei monogastrischen Nutztieren zu sein. Um die Möglichkeit des Einsatzes pflanzlicher Phytasen als Futterzusatzstoffe zu überprüfen, wäre es demnach für die Zukunft wichtig, weitere Untersuchungen zur Überprüfung der Temperaturstabilität zu machen, um zu sehen, ob beispielsweise beim Pelletiervorgang die hohen Phytaseaktivitäten noch erhalten bleiben. Auch ist es wichtig, die proteolytische Stabilität sowie das pH-Verhalten der einzelnen pflanzlichen Phytasen näher zu untersuchen und abzuklären, ob die Effizienz des Phytatabbaus auch im tierischen Verdauungstrakt erhalten bleibt.

Bezüglich der Anforderungen an Enzyme als Futterzusatzstoffe, wie Temperaturstabilität, pH-Verhalten und proteolytische Stabilität, haben pilzliche Phytasen einige Unzulänglichkeiten, nämlich die Empfindlichkeit gegenüber Hitze beim Pelletieren (*Aspergillus*) und ihre Inaktivierung durch Verdauungsenzyme, wie sie unter natürlichen Bedingungen im Magen vorkommen. Dennoch sind die pilzlichen Phytasen auf dem Markt dominierend, da sie bisher wesentlich ökonomischer produziert werden können als die bakteriellen Phytasen.

Um die *Penicillium*-Phytase besser beurteilen zu können, wären weitere Untersuchungen, die proteolytische Stabilität und die Effektivität des Phytatabbaus betreffend, sinnvoll.

Die *Klebsiella*- und *E.coli*-Phytasen weisen keine gute Temperaturstabilität auf. Dem gegenüber steht die gute Effektivität des Phytatabbaus bis hin zum Ins(2)P und die gute proteolytische Stabilität beider Phytasen. Es wäre ein sinnvolles Ziel, durch zukünftige Forschung eine Möglichkeit zu finden, die Temperaturstabilität der *Klebsiella*-Phytase gentechnisch zu verbessern, wie es im Falle der *Consensus*- und *E.coli* Phy9X-Phytasen gelungen ist.

Die *Bacillus*-Phytase hat mehrere vorteilhafte Eigenschaften. Zum einen hat diese Phytase als einzige bakterielle Phytase das pH-Optimum im neutralen Bereich, weist aber auch bei

pH 5,5 schon etwa 70% Aktivität auf, was dafür spricht, dass diese Phytase bei der Passage des Magens schon etwas katalytische Aktivität zeigt, um dann im Dünndarm mit 100% Aktivität wirken zu können. Weitere positive Eigenschaften sind die ausgeprägte Substratspezifität für Phytat, die gute Temperaturstabilität und die hohe proteolytische Stabilität. Nachteilig ist allerdings, dass die *Bacillus*-Phytase Phytat nur bis zum InsP3 abbaut.

Die gentechnisch veränderten Phytasen *Consensus* und *E.coli* Phy9X zeigen eine deutliche Steigerung in der Temperaturstabilität gegenüber den unveränderten mikrobiellen Phytasen. Beide Phytasen zeigen außerdem gegenüber den „Elternphytasen“ eine deutlich höhere Stabilität gegenüber den Bedingungen im Magen.

Eine Zusammenfassung der Eigenschaften der verschiedenen mikrobiellen Phytasen ist in Tabelle 41 im Anhang aufgeführt.

### **2.5 Zielstellung der eigenen Untersuchungen**

#### ***In-vitro*-Charakterisierung der Phytasen**

In dieser Studie sollen zunächst die *E.coli*-Phytasen im Vergleich zur kommerziell erhältlichen *Aspergillus*-Phytase Natuphos® auf ihre biochemischen Eigenschaften untersucht werden. Zusätzlich sollen die *E.coli*-Phytasen in einem Pelletversuch auf ihre Eignung als Futterzusatzstoff in Bezug auf die Hitzestabilität untersucht werden.

#### **Analyse der Inositolphosphate aus dem enzymatischen Abbau durch Phytasen**

Die Abbauwege der *E.coli*-Phytasen im Vergleich zur kommerziell erhältlichen *Aspergillus*-Phytase Natuphos®, sowie der Abbauweg einer *Bacillus*-Phytase sollen in dieser Untersuchung gezeigt werden. Um mögliche synergistische Effekte bei der Kombination zweier Phytasen beim Phytatabbau zu finden, soll ein kombinierter Einsatz der *E.coli*- und *Bacillus*-Phytase erfolgen. Diese Untersuchungen des Phytatabbaus sollen mittels HPLC durchgeführt werden.

#### ***In-vivo*-Fütterungsversuch mit Absetzferkeln**

Es soll in einem Fütterungsversuch gezeigt werden, wie gut sich die *E.coli*-Phytase im Hinblick auf Leistung, Phosphor-, Calcium- und Rohascheverdaulichkeit sowie im Bezug auf die Freisetzung von Phosphor aus Phytat als Futterzusatzstoff eignet. Der Versuch soll vergleichend mit dem kommerziell erhältlichen Futterzusatz Natuphos® (*Aspergillus*-Phytase) durchgeführt werden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Reagenzien/Chemikalien

Tabelle 3: Reagenzien/Chemikalien

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
1. Ammoniak NH <sub>3</sub> (D 0,90)	
2. Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D
3. Ammoniumhydroxid 25% NH <sub>4</sub> OH	Merck, Darmstadt, D
4. Ammoniummonovanadat NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, D
5. Bovines Serumalbumin EEC No.232-936-2	Sigma, St. Louis, USA
6. Calciumchlorid CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Sigma, St. Louis, USA
7. Citronensäure, Monohydrat C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> * H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D
8. Diethylether 99,5% ( 50ppm H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe, D
9. EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III) C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 2H <sub>2</sub> O 99%	Roth, Karlsruhe, D
10. Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D
11. Eisen(III)-chlorid FeCl <sub>3</sub> , wasserfrei zur Synthese	Merck, Darmstadt, D
12. Essigsäure 100% CH <sub>3</sub> COOH	Merck, Darmstadt, D
13. Glycin H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> COOH	Merck, Darmstadt, D
14. Kaliumdihydrogenphosphat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, D
15. L-Ascorbinsäure C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Roth, Karlsruhe, D
16. Natriumacetat, wasserfrei CH <sub>3</sub> COONa	Merck, Darmstadt, D
17. Natronlauge NaOH	Merck, Darmstadt, D
18. Pankreatin, aus porcine Pankreas P-1500	Sigma, St. Louis, USA
19. Pepsin, aus porciner Magenmucosa P-7012 (2540 units/mg solid)	Sigma, St. Louis, USA
20. Phytinsäure, Natriumsalz (P3168) C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>24</sub> P <sub>6</sub> Na <sub>12</sub> *10 H <sub>2</sub> O	Sigma, St. Louis, USA
21. Salpetersäure 65% HNO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, D
22. Salzsäure 37% HCl	Merck, Darmstadt, D
23. Schwefelsäure 98% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe, D
24. Trichloressigsäure CCl <sub>3</sub> COOH	Merck, Darmstadt, D
25. Triethanolamin C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> 99%, zur Synthese	Roth, Karlsruhe, D
26. Tri-Natriumcitrat-Dihydrat C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D
27. Tris-Hydrochlorid C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> HCl	Roth, Karlsruhe, D

Bei dem für die Analysen verwendeten Wasser handelt es sich um entionisiertes Wasser (in der nachfolgenden Beschreibung der Analytik nur als Wasser bezeichnet).

##### 3.1.1 In die Untersuchungen einbezogene Enzympräparate

1. **Bacillus FZB45-Phytase**, *Bacillus amyloliquefaciens*, HU Berlin, Institut für Biologie, Arbeitsgruppe Bakteriengenetik
2. **FB-Phytase** Enzymgranulat und -pulver, *E.coli*, Fuda Biotech, FuZhou City, Fujian, P.R.China, 350002
3. **Natuphos® 5000 G** Enzymgranulat, Gen: *Aspergillus ficuum*, Produktionsstamm: *Aspergillus niger*, BASF, Ludwigshafen, Deutschland
4. **Optiphos** Enzymgranulat und -pulver, Gen: *E.coli*, Expressionssystem: *Pichia pastoris*, United Feeds, Sheridan, IN 46069 USA
5. **ZY-Phytase** Enzymgranulat (*Peniophora lycii*), Lohmann, Cuxhaven, Deutschland
6. **Bio-Feed Phytase** (Standard), Batch: 84-11101, Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark

### 3.2 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Geräte	Hersteller
1. Filterpapier, Faltenfilter S&S 595 ½	Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland
2. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC): Autosampler/Chromatography Compartment AS50; Gradientenpumpe GP40; Isocratische Pumpe IP20; UV-Detektor AD25	Dionex, Idstein, Deutschland
3. HPLC-Säule: Mono-Q 5/50 GL- 5 cm	Amersham Biosciences, München, Deutschland
4. Labor-pH-Meter, Knick 765 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
5. Lyophilisator Loc-1m, Alpha 1-4	Christ, Osterode im Harz, Deutschland
6. Lyophilisator Lyo Vac GT 2	Leybold-Heraeus, Hanau, Deutschland
7. Magnetrührer HI 300N	Hanna Instruments, Kehl/Rhein, Deutschland
8. Magnetrührer Mini MR Standard	IKA Labortechnik, Wilmington NC, USA
9. Magnetrührer RT 5 Power	IKA Labortechnik, Wilmington NC, USA
10. Retsch-Mühle ZM200	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
11. Schüttler, SM-30	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
12. Schüttler, Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
13. Spectrophotometer Specord S 600	Analytik Jena, Jena, Deutschland
14. Spectrophotometer, Ultrospec 3300 Pro	Biochrom, Cambridge, England
15. Trockenschrank, Heraeus T5050	Heraeus, Hanau, Deutschland
16. Ultraschallbad Sonorex Super RK 106	Bandelin, Berlin, Germany
17. Waage, Sartorius research	Sartorius, Göttingen, Deutschland
18. Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
19. Wasserbad Büchi 461	Büchi, Flawil, Schweiz
20. Zentrifuge, Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
21. Zentrifuge, Heraeus Multifuge® 3S-R	Kendro, Hanau, Deutschland

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Bestimmung der Phytaseaktivität in Rohenzymen und Futtermitteln

Die Bestimmung der Phytaseaktivität wurde in Anlehnung an die von Engelen et al. (1994) beschriebene Methode durchgeführt und beruht auf der kolorimetrischen Quantifizierung von durch Phytathydrolyse freigesetztem Phosphor bei einer Wellenlänge von 415 nm.

Phytase setzt aus dem Substrat Natriumphytat Phosphat frei. Die Reaktion wird durch Zugabe von saurer Molybdat-Vanadat-Lösung gestoppt, wobei ein gelb gefärbter Komplex entsteht. Die Farbintensität des Komplexes wird als Maß für die Menge freigesetzten Phosphats bei 415 nm photometrisch gemessen.

##### 3.3.1.1 Reagenzien

###### a) Pufferlösung (Acetatpuffer)

18,1 g Natriumacetat wasserfrei und 0,147 g Calciumchlorid werden in 900 ml Wasser gelöst und es werden 1,68 ml Eisessig hinzugegeben. Der pH-Wert wird mittels Eisessig bzw. Natronlauge auf  $5,5 \pm 0,02$  eingestellt und das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.

###### b) Pufferlösung (Acetatpuffer) mit Triton X-100

18,1 g Natriumacetat wasserfrei und 0,147 g Calciumchlorid werden in 900 ml Wasser gelöst und es werden 1,68 ml Eisessig und 2 Tropfen Triton X-100 hinzugegeben. Der pH-Wert wird mittels Eisessig bzw. Natronlauge auf  $5,5 \pm 0,02$  eingestellt und das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.

###### c) Substratlösung

Es werden 8,4 g Natriumphytat in 900 ml Acetatpuffer (a) gelöst, der pH-Wert mittels Eisessig bzw. Natronlauge auf  $5,5 \pm 0,02$  eingestellt und das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

###### d) Verdünnte Salpetersäure

350 ml Salpetersäure 65% werden langsam unter Rühren zu 650 ml Wasser hinzugefügt.

###### e) Ammoniumheptamolybdatlösung

100 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat werden in 900 ml Wasser gelöst. Es werden 10 ml Ammoniumhydroxid 25% hinzugefügt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt vier Wochen haltbar.

###### f) Ammoniummonovanadatlösung

2,35 g Ammoniummonovanadat werden bei 60°C in 400 ml Wasser unter Rühren vollständig gelöst. Es werden 20 ml verdünnte Salpetersäure (d) hinzugegeben und nach dem Abkühlen

mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt vier Wochen haltbar.

*g) Farb-Stopp-Lösung*

250 ml Ammoniumheptamolybdatlösung (e) und 250 ml Ammoniummonovanadatlösung (f) mischen und 165 ml Salpetersäure 65% hinzugeben. Nach Abkühlung auf 1000 ml mit Wasser auffüllen. Die Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

**3.3.1.2 Standardlösung**

Als Standard wurde eine Phytase (Novozymes, Standard: Bio-Feed Phytase, Batch: 84-11101) mit einer Aktivität von 5240 FTU/g verwendet.

47,7 mg des Phytase-Standards mit 5240 FTU/g werden in einem 100 ml-Messkolben in Acetatpuffer mit Triton X-100 (b) gelöst und dann auf 100 ml mit diesem Puffer aufgefüllt. 1,5 ml dieser Lösung werden abgenommen, in einen 50 ml-Messkolben gegeben und auf 50 ml mit Acetatpuffer mit Triton X-100 (b) aufgefüllt. Es werden Verdünnungen des Standards hergestellt mit 0,0075 FTU/ml, 0,015 FTU/ml, 0,03 FTU/ml, 0,045 FTU/ml, 0,06 FTU/ml und 0,0675 FTU/ml. Die Lösung muss täglich frisch hergestellt werden. Die Standardsubstanz ist bei -18°C aufzubewahren.

**3.3.1.3 Probenvorbereitung**

**3.3.1.3.1 Rohenzym**

Eine je nach deklarerter Aktivität des Enzyms genau abgewogene Menge des pulverigen bzw. granulierten Rohenzym wird in 25 ml Acetatpuffer mit Triton X-100 (b) 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden weitere 25 ml Acetatpuffer mit Triton X-100 (b) hinzugegeben und gemischt. Der Überstand wird 10 min bei 2600 g zentrifugiert. 1,5 ml dieser Lösung werden in einen 50 ml-Messkolben gegeben und auf 50 ml mit Acetatpuffer mit Triton X-100 (b) aufgefüllt. Von dieser Lösung werden im Doppelansatz eine 1:5- und eine 1:10-Verdünnung im Reagenzglas mit Acetatpuffer mit Triton X-100 (b) hergestellt. Zusätzlich werden ebenfalls im Doppelansatz als Blindwerte die gleichen Verdünnungen hergestellt. Das Endvolumen der zu analysierenden Verdünnungsstufen beträgt jeweils 2,0 ml.

**3.3.1.3.2 Futtermittel**

Die Futtermittel werden mit der Retsch-Mühle (Siebstärke: 1,5 mm) gemahlen. Es werden im Doppelansatz 0,5 g der Probe in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Nach Zugabe von 50 ml Acetatpuffer mit Triton X-100 (b) werden die Proben im Schüttler bei Raumtemperatur 60 min extrahiert. Der Überstand wird dann durch Filterpapier gefiltert und 10 min bei 2600 g zentrifugiert. Der Überstand wird dann in Reagenzgläser gegeben und mit Acetatpuffer mit Triton X-100 (b) auf eine Phytaseaktivität von 0,01- 0,07 FTU/ml verdünnt. Das Endvolumen der zu analysierenden Verdünnungsstufen beträgt jeweils 2,0 ml.

### 3.3.1.4 Analyse der Phytaseaktivität

#### 3.3.1.4.1 Standards und Proben

Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Dann werden in definierten Zeitabständen je 4,0 ml Substratlösung (c) hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Nach weiteren 60 min Inkubation werden in wieder gleichen Zeitabständen zu jeder Probe 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (g) hinzugegeben, gut gemischt und die Proben aus dem Wasserbad entnommen. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

#### 3.3.1.4.2 Standard- und Probenblindwerte

Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Dann werden in definierten Zeitabständen je 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (g) hinzugegeben, gut gemischt und dann zu jeder Probe 4,0 ml Substratlösung (c) hinzugegeben, gut gemischt und die Proben aus dem Wasserbad entnommen. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

#### 3.3.1.4.3 Berechnung der Phytaseaktivität

Die Absorption aller Proben wird bei 415 nm photometrisch gemessen, nachdem der Nullpunkt des Gerätes für die Messung mittels Wasser festgelegt wurde.

Die gemessene Absorption der Proben- und Standardblindwerte wird von der Absorption der Proben und Standards subtrahiert. Die Standardkurve (Absorptionsdifferenz / FTU/ml) wird mittels der sechs Standardwerte aufgestellt. Die Absorption der zu bestimmenden Proben wird mit Hilfe der Standardkurve abgelesen und unter Berücksichtigung der Einwaage und Verdünnung wird die Phytaseaktivität berechnet. Die Phytaseaktivität wird in Phytaseeinheiten pro g Rohenzym (FTU/g) bzw. pro kg Futtermittel (FTU/kg) angegeben. 1 FTU ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol Phosphat pro Minute unter Testbedingungen (pH 5,5, 37°C, Substratkonzentration von 5,1 mmol) freisetzt.

### 3.3.2 Bestimmung der Phytaseaktivität von Optiphos

Die Bestimmung der Phytaseaktivität wurde nach der von den Herstellern (United Feeds, Sheridan, IN 46069 USA) beschriebenen Methode durchgeführt. Im ersten Schritt dieser Zwei-Stufen-Analyse reagiert die Phytase 15 min bei 37°C mit dem Substrat Natriumphytat in einem Citrat-Puffer bei pH 5,5, um die Freisetzung anorganischen Phosphats zu katalysieren. Die Phytase-Reaktion wird dann durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) gestoppt und die Menge freigesetzten Phosphors in einem zweiten Schritt photometrisch gemessen. In diesem zweiten Schritt bildet Phosphat einen blauen Phosphomolybdat-Komplex mit einem maximalen Absorptionskoeffizient bei 820 nm.

### 3.3.2.1 Reagenzien

a) *Natriumcitratpuffer pH 5,5 (0,2 mol)*

a.1) *Natriumcitratlösung 0,2 mol*

58,82 g Natriumcitrat werden in 1000 ml Wasser gelöst.

a.2) *Zitronensäurelösung 0,2 mol*

42,02 g Zitronensäure werden in 1000 ml Wasser gelöst.

Zu Lösung (a.1) wird eine solche Menge Lösung (a.2) hinzugegeben, dass der entstehende Puffer (a) einen pH-Wert von 5,5 hat.

Puffer und Pufferkomponenten können bis zu fünf Tagen bei 4°C aufbewahrt werden.

b) *Substratlösung*

1,0 g Natriumphytat wird in einem 100 ml-Messkolben in 65 ml Natriumcitratpuffer (a) gelöst, der pH- Wert durch Zugabe von Zitronensäure (a.2) auf 5,5 eingestellt und im Anschluss mit Natriumcitratpuffer (a) auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

c) *TCA-Stopp-Lösung (15% Trichloressigsäure)*

150 g TCA in 750 ml Wasser unter Rühren lösen und auf 1000 ml mit Wasser auffüllen. Die Lösung ist bei 25°C bis zu 30 Tagen haltbar.

d) *Ascorbinsäurelösung 10%*

10 g Ascorbinsäure werden in einem 100 ml-Messkolben in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung ist bei 4°C bis zu zwei Tagen haltbar.

e) *Ammoniummolybdatlösung 2,5%*

2,5 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat werden in einem 100 ml-Messkolben in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung ist lichtgeschützt bei 25°C bis zu 14 Tagen haltbar.

f) *1,0 M Schwefelsäure*

55,5 ml konzentrierte Schwefelsäure (18 mol) werden langsam zu 944,5 ml Wasser hinzugegeben und gemischt. Bei 25°C lagern.

g) *Kaliumphosphat Standardlösung (9,0 mmol)*

0,6124 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in 500 ml Wasser gelöst. Bei 4°C bis zu 14 Tagen haltbar.

*h) Reagenz C*

Drei Teile Schwefelsäure (*f*), ein Teil Ammoniummolybdatlösung (*e*) und ein Teil Ascorbinsäurelösung (*e*) werden gründlich gemischt. Die Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

**3.3.2.2 Standardlösung**

Es werden durch Verdünnung der 9,0 mmol Standardlösung (*g*) mit Wasser eine Phosphat-Standardreihe mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: 5,6, 11,3, 22,5, 45,0 und 90,0  $\mu\text{mol}$ . Die Standards können bei 4°C aufbewahrt und bis zu fünf Tagen verwendet werden.

**3.3.2.3 Probenvorbereitung**

1,0 g granuliertes Enzym (Optiphos) wird in einen 100 ml-Messkolben gegeben, 100 ml auf 37°C vortemperierter Natriumcitratpuffer (*a*) hinzugefügt und auf dem Magnetrührer 90 min gerührt. Es werden aus diesem Enzymkonzentrat eine 1:22- Verdünnung und daraus weitere Verdünnungsstufen von 1:22 sowie Verdünnungen ober- und unterhalb dieser Stufe hergestellt.

**3.3.2.4 Analyse der Phytaseaktivität**

**3.3.2.4.1 Proben und Probenblindwerte - Analyseschritt 1**

Die Reagenzgläser mit 0,5 ml jeder Proben-Verdünnungsstufe und die Blindwerte mit je 0,5 ml Inhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Proben auf 37°C zu erwärmen. Dann werden in definierten Zeitabständen je 0,5 ml Substratlösung (*b*) zu den Proben und 1,0 ml TCA-Stop-Lösung (*c*) zu den Standards hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Die Blindwerte werden aus dem Wasserbad genommen und es wird zu jedem Reagenzglas 0,5 ml Substratlösung (*b*) hinzugegeben und gemischt. Nach weiteren 15 min Inkubation wird in wieder gleichen Zeitabständen zu jeder Probe 1,0 ml TCA-Stopp-Lösung (*c*) hinzugegeben, gut gemischt und die Proben aus dem Wasserbad entnommen.

**3.3.2.4.2 Proben, Standards und Standardblindwerte - Analyseschritt 2**

Von den Proben und Probenblindwerten aus Analyseschritt 1 wird eine 1:10-Verdünnung hergestellt (0,2 ml jeder Probe und 1,8 ml Natriumcitratpuffer (*a*)). Von jeder Standard-Verdünnungsstufe werden 2,0 ml und als Reagenzienblindwert 2,0 ml Wasser in ein Reagenzglas pipettiert. Zu jedem Reagenzglas werden 2,0 ml frische Reagenz C (*h*) hinzugegeben, gut gemischt und alle Proben und Standards für 15 min bei 50°C in ein Wasserbad gestellt. Die Reagenzgläser werden nach 15 min aus dem Wasserbad entnommen. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wird die Absorption bei 820 nm gegen den Reagenzienblindwert gemessen.

### 3.3.2.4.3 Berechnung der Phytaseaktivität

Die Standardkurve (Absorptionsdifferenz / nmol/ml) wird mittels der Standardwerte aufgestellt. Die Phosphatkonzentration der Proben (in nmol/ml) wird anhand der Standardkurve abgelesen. Die Phytaseaktivität der Probe wird errechnet, indem man die abgelesene Phosphatkonzentration (nmol/ml) durch die Hydrolysezeit (15 min) dividiert und das Ergebnis mit 4 (Verdünnungsfaktor der Phytasereaktion = 0,5 ml Probe in 2,0 ml Reaktions-Mix) und mit 10 (Verdünnung der Phytathydrolysereaktion in der Phosphat-Messung = 0,2 ml + 1.8 ml H<sub>2</sub>O) multipliziert. Das Ergebnis wird dann multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor der Originalprobe, um die Phytaseaktivität in mU zu erhalten (nmol freigesetzter P<sub>i</sub>/min) - oder umgerechnet in Units (nmol/1000 = µmol freigesetzter P<sub>i</sub>/min). Die Phytaseaktivität wird in Phytaseeinheiten pro g Rohenzym (FTU/g) angegeben. 1 FTU ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol Phosphat pro Minute unter Testbedingungen (pH 5,5, 37°C, Substratkonzentration von 5,1 mmol) freisetzt.

### 3.3.3 Bestimmung der Phytaseaktivität von FB-Phytase

Die Bestimmung der Phytaseaktivität wurde nach der von Fuda Biotech (FuZhou City, FuJian, P.R.China, 350002) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Bestimmung der Phytaseaktivität basiert auf der kolorimetrischen Quantifizierung von durch Phytathydrolyse freigesetztem Phosphor unter Verwendung von Ammoniummolybdat als Farbreagenz. Die photometrische Messung wird bei einer Wellenlänge von 700nm durchgeführt.

#### 3.3.3.1 Reagenzien

##### a) Puffer (0,1 mol/l)

5,742 g Natriumacetat wasserfrei, 0,5 g Triton X-100 und 0,5 g bovines Serumalbumin werden in 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mittels Eisessig bzw. Natronlauge auf  $5,0 \pm 0,02$  eingestellt und das Volumen auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

##### b) Substratlösung

577,4 mg Natriumphytat und 574,2 mg Natriumacetat wasserfrei werden in 90 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mittels Eisessig bzw. Natronlauge auf  $5,0 \pm 0,02$  eingestellt und das Volumen auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.

##### c) Reaktionsstopplösung (TCA 5%)

5,0 g TCA werden in 100 ml Wasser gelöst.

##### d) Ammoniummolybdatlösung (Lösung A)

7,5 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat werden in 400 ml Wasser gelöst. Es werden langsam 22 ml konzentrierte Schwefelsäure (18 mol) hinzugegeben und gut gemischt. Das Volumen wird auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt. Diese Lösung ist lichtgeschützt bei 4°C bis zu vier Wochen haltbar.



### *e) Eisensulfatlösung 2,7% (Lösung B)*

13,5 g Eisensulfat werden in 500 ml Wasser gelöst. Diese Lösung ist lichtgeschützt bei 4°C bis zu vier Wochen haltbar.

### *f) Farbreagenz*

100 ml Lösung A (*d*) und 25 ml Lösung B (*e*) werden gut gemischt. Diese Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

### *g) Kaliumdihydrogenphosphatlösung (4,0 mmol/l)*

Kaliumdihydrogenphosphat vor Verwendung im Trockenschrank bei 60°C trocknen. 0,136 g Kaliumdihydrogenphosphat in 250 ml Wasser lösen. Diese Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

### **3.3.3.2 Standardlösung**

Durch schrittweise Verdünnung der Kaliumdihydrogenphosphatlösung (*g*) werden die Arbeitsstandards mit Konzentrationen von 0,0, 0,8, 1,6, 2,4, 3,2 und 4,0 mmol/l hergestellt.

### **3.3.3.3 Probenvorbereitung**

50 mg des granulierten FB-Phytase-Rohenzym (5000 FTU/g) werden in einen 50 ml-Messkolben gegeben und mit 25 ml Puffer (*a*) 60 min auf dem Magnetrührer gerührt. Es werden weitere 25 ml Puffer (*a*) hinzugegeben und gut gemischt. Der Überstand wird 10 min bei 2600 g zentrifugiert. 1,0 ml des Überstandes werden in einen 25 ml-Messkolben gegeben und mit Puffer (*a*) auf 25 ml aufgefüllt. 1,0 ml dieser Lösung werden wiederum zu 4,0 ml Puffer (*a*) hinzugegeben und gut gemischt. Die so erhaltene Probenlösung hat eine Phytaseaktivität von 0,04 FTU/ml.

### **3.3.3.4 Analyse der Phytaseaktivität**

#### **3.3.3.4.1 Standards und Proben**

0,2 ml jedes Arbeitsstandards und 0,2 ml der Enzymprobenlösung werden jeweils im Doppelansatz in Reagenzgläser pipettiert. Die Reagenzgläser mit je 0,2 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Dann werden in definierten Zeitabständen je 0,8 ml Substratlösung (*b*) hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Nach weiteren 30 min Inkubation bei 37°C wird in wieder gleichen Zeitabständen zu jeder Probe 1,0 ml Reaktionsstopplösung (*c*) hinzugegeben, gut gemischt und die Proben werden aus dem Wasserbad entnommen. In jedes Reagenzglas wird 1,0 ml Farbreagenz (*f*) hinzugegeben und gut gemischt.

#### **3.3.3.4.2 Standard- und Probenblindwerte**

Als Standardblindwert werden 0,2 ml Puffer (*a*) und als Probenblindwert 0,2 ml der Enzymprobenlösung jeweils im Doppelansatz in Reagenzgläser pipettiert. Die Reagenzgläser mit je 0,2 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein

Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Dann werden in definierten Zeitabständen je 1,0 ml Reaktionsstopplösung (c) hinzugegeben, gut gemischt und anschließend 0,8 ml Substratlösung (b) hinzupipettiert, gut gemischt und die Proben werden aus dem Wasserbad entnommen. In jedes Reagenzglas wird 1,0 ml Farbreagenz (f) hinzugegeben und gut gemischt. Nach dem Abkühlen der Proben und Standards auf Raumtemperatur wird die Absorption bei 700 nm gegen den Probenblindwert gemessen.

### 3.3.3.4.3 Berechnung der Phytaseaktivität

Die ermittelten Absorptionen der Standardblindwerte werden von den zugehörigen Standard-Absorptionen subtrahiert und dann die Standardkurve erstellt: Die Absorptionsdifferenz wird auf der x-Achse und die korrespondierende Menge Kaliumdihydrogenphosphat (mmol/l) auf der y-Achse aufgetragen. Es wird die Ausgleichsgerade durch den Nullpunkt gezogen und die Geradengleichung aufgestellt. Die korrigierte Absorption wird bestimmt, indem man die Differenz zwischen dem Absorptionswert der Probe und dem Probenblindwert berechnet. Die Phytaseaktivität in FTU/g wird errechnet, indem man die Steigung der Standardgeradengleichung mit der korrigierten Absorption der Probe und dem Verdünnungsfaktor der Probe multipliziert und das Ergebnis durch das Produkt aus Probenmenge (0,2 ml), Probeneinwaage (0,05 g) und Reaktionszeit (30 min) dividiert.

## 3.3.4 Charakterisierung der Phytasen

### 3.3.4.1 Bestimmung des pH-Optimums

#### 3.3.4.1.1 Reagenzien

a) *Glycin-Puffer (200 mmol) pH 2,0, 2,5, 3,0*

Für jeden der drei Puffer (mit unterschiedlichen pH-Werten) werden 7,5 g Glycin und 0,0734 g Calciumchlorid (1 mmol) in 400 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mit Salzsäure bzw. Natronlauge entsprechend eingestellt und das Volumen auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt.

b) *Natriumacetatpuffer (200 mmol) pH 3,5, 4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5*

Für jeden der sechs Puffer (mit unterschiedlichen pH-Werten) werden 8,2 g Natriumacetat und 0,0734 g Calciumchlorid (1 mmol) in 400 ml Wasser gelöst, der pH-Wert wird mittels Eisessig bzw. Natronlauge entsprechend eingestellt und das Volumen auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt.

c) *Tris-HCl-Puffer (200 mmol) pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0*

Für jeden der fünf Puffer (mit unterschiedlichen pH-Werten) werden 15,76 g Tris-HCl und 0,0734 g Calciumchlorid (1 mmol) in 400 ml Wasser gelöst, der pH-Wert wird mittels Salzsäure bzw. Natronlauge entsprechend eingestellt und das Volumen auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt.

Alle Puffer (a,b,c) sind bei 4°C gekühlt 14 Tage haltbar, es müssen aber vor Gebrauch die pH-Werte überprüft werden.

*d) Substratlösung (10 mmol)*

Es wird aus allen Puffern (*a,b,c*) für alle pH-Werte eine passende Substratlösung hergestellt: 0,92 g Natriumphytat werden in 80 ml der jeweiligen Pufferlösung (*a,b,c*) gelöst, der pH-Wert je nach Art des Puffers mittels Salzsäure, Eisessig bzw. Natronlauge auf den jeweiligen pH des Puffers eingestellt und dann mit dem entsprechenden Puffer (*a,b,c*) auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösungen müssen täglich frisch hergestellt werden.

*e) Enzymlösung (0,02-0,08 FTU/ml)*

Von den zu untersuchenden Enzymen werden Lösungen mit einer Phytaseaktivität im Bereich von 0,02-0,08 FTU/ml hergestellt. Hierzu wird eine entsprechende Menge des Enzyms in Pufferlösung (*a,b,c*) gelöst und eine entsprechende Verdünnung vorgenommen. Für jeden zu untersuchenden pH-Bereich (Pufferlösung) wird eine Enzymlösung hergestellt.

*f) Verdünnte Salpetersäure*

350 ml Salpetersäure 65% werden langsam unter Rühren zu 650 ml Wasser hinzugefügt.

*g) Ammoniumheptamolybdatlösung*

100 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat werden in 900 ml Wasser gelöst. Es werden 10 ml Ammoniumhydroxid 25% hinzugefügt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt vier Wochen haltbar.

*h) Ammoniumvanadatlösung*

2,35 g Ammoniummonovanadat werden bei 60°C in 400 ml Wasser unter Rühren vollständig gelöst. Es werden 20 ml verdünnte Salpetersäure (*d*) hinzugegeben und nach dem Abkühlen mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt vier Wochen haltbar.

*i) Farb-Stopp-Lösung*

250 ml Ammoniumheptamolybdatlösung (*e*) und 250 ml Ammoniumvanadatlösung (*f*) werden in einem 1000 ml-Messkolben gemischt und 165 ml Salpetersäure 65% hinzugegeben. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit Wasser auf 1000 ml auffüllen und gut mischen. Die Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

### **3.3.4.1.2 Standardlösung**

Als Standard wurde eine Phytase (Novozymes, Standard: Bio-Feed Phytase, Batch: 84-11101) mit einer Aktivität von 5240 FTU/g verwendet.

47,7 mg des Phytase-Standards mit 5240 FTU/g werden in einem 100 ml-Messkolben in Natriumacetatpuffer pH 5,5 (*b*) gelöst und dann auf 100 ml mit diesem Puffer aufgefüllt. 1,5 ml dieser Lösung werden abgenommen, in einen 50 ml-Messkolben gegeben und auf 50 ml mit Natriumacetatpuffer pH 5,5 (*b*) aufgefüllt. Es werden Verdünnungen des Standards hergestellt mit 0,0075 FTU/ml, 0,015 FTU/ml, 0,03 FTU/ml, 0,045 FTU/ml, 0,06 FTU/ml und

0,0675 FTU/ml. Die Lösung muss täglich frisch hergestellt werden. Die Standardsubstanz ist bei -18°C aufzubewahren.

#### **3.3.4.1.3 Analyse des pH-Optimums - Standards und Proben**

Es wird von jeder Enzymlösung im Doppelansatz je 1,0 ml und zusätzlich 1,0 ml Puffer (*a,b* oder *c*) in ein Reagenzglas pipettiert. Von den Standardlösungen werden ebenfalls 2,0 ml jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz in Reagenzgläser gegeben. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Anschließend werden in definierten Zeitabständen je 4,0 ml der Substratlösung (*d*) mit passendem pH hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Nach weiteren 60 min Inkubation werden in wieder gleichen Zeitabständen zu jeder Probe 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (*i*) hinzugegeben, gut gemischt und die Proben aus dem Wasserbad entnommen. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

#### **3.3.4.1.4 Analyse des pH-Optimums - Standard- und Probenblindwerte**

Es wird von jeder Enzymlösung im Doppelansatz je 1,0 ml und zusätzlich 1,0 ml Puffer (*a,b* oder *c*) in ein Reagenzglas pipettiert. Von den Standardlösungen werden ebenfalls 2,0 ml jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz in Reagenzgläser gegeben. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Dann werden die Proben aus dem Wasserbad entnommen, in definierten Zeitabständen je 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (*i*) hinzugegeben, gut gemischt und anschließend wird zu jeder Probe 4,0 ml Substratlösung (*d*) mit passendem pH hinzugegeben und gut gemischt. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

#### **3.3.4.1.5 Berechnung der Phytaseaktivität**

Die Absorption aller Proben wird bei 415 nm photometrisch gemessen, nachdem der Nullpunkt für die Messung mittels Wasser festgelegt wurde.

Die gemessene Absorption der Proben- und Standardblindwerte wird von der Absorption der Proben und Standards subtrahiert. Die Standardkurve (Absorptionsdifferenz / FTU/ml) wird mittels der sechs Standardwerte aufgestellt. Die Absorption der zu bestimmenden Proben wird mit Hilfe der Standardkurve abgelesen und unter Berücksichtigung der Einwaage und Verdünnung wird die Phytaseaktivität berechnet. Die Phytaseaktivität wird in Phytaseeinheiten pro g Rohenzym (FTU/g) angegeben. 1 FTU ist die Menge Enzym, welche 1 µmol Phosphat pro Minute unter Testbedingungen (pH 5,50, 37°C, Substratkonzentration von 5,1 mmol) freisetzt. Der pH-Wert, bei dem die höchste Phytaseaktivität ermittelt wird, entspricht dem 100%-Wert und entspricht somit dem pH-Optimum des entsprechenden Enzyms. Von den Ergebnissen des Enzyms bei den anderen pH-Werten wird ebenfalls die relative Phytaseaktivität in Prozent berechnet, indem das Ergebnis in FTU/g durch das höchste Ergebnis (100%-Wert) in FTU/g dividiert und dieses Ergebnis mit dem Faktor 100 multipliziert wird.

### **3.3.4.2 Bestimmung des Temperatur-Optimums**

Nachdem das pH-Optimum für das Enzym ermittelt wurde, erfolgt die Analyse des Temperatur-Optimums nach dem gleichen Schema in dem entsprechenden optimalen pH-Wert des Enzyms und mit einer Inkubationsdauer von 60 Minuten. Die Analyse erfolgt im Wasserbad bei 30°C, 40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C und 80°C. Die Absorptionsmessung und die Berechnung der Phytaseaktivität werden so durchgeführt, wie im Abschnitt 3.3.4.1.5 beschrieben.

#### **3.3.4.2.1 Reagenzien**

Es werden die gleichen Reagenzien hergestellt, wie oben beschrieben (Abschnitt 3.3.4.1.1, a-i). Als Pufferlösung wird nur der Puffer mit dem optimalen pH-Wert des zu analysierenden Enzyms hergestellt. Die Substratlösung (*d*) und die Enzymlösung (*e*) werden auf den optimalen pH-Wert des Enzyms eingestellt. Die Standardlösung wird, wie unter 3.3.4.1.2 beschrieben, zubereitet.

### **3.3.4.3 Bestimmung der Temperatur-Stabilität in Pufferlösung**

Nachdem pH-Optimum und Temperatur-Optimum für das Enzym ermittelt wurden, erfolgt die Analyse der Temperatur-Stabilität in dem entsprechenden optimalen pH-Wert des Enzyms. Die Analyse wird im Wasserbad bei 50°C, 60°C und 70°C sowie Zeitintervallen von 0, 10, 20, 40, 60 und 120 min durchgeführt.

#### **3.3.4.3.1 Reagenzien**

Es werden die gleichen Reagenzien hergestellt, wie oben beschrieben (Abschnitt 3.3.4.1.1, a-i). Als Pufferlösung wird nur der Puffer mit dem optimalen pH-Wert des zu analysierenden Enzyms hergestellt. Die Substratlösung (*d*) und die Enzymlösung (*e*) werden auf den optimalen pH-Wert des Enzyms eingestellt. Die Standardlösung wird, wie unter 3.3.4.1.2 beschrieben, zubereitet.

#### **3.3.4.3.2 Analyse der Temperatur-Stabilität - Schritt 1**

Es wird von jeder Enzymlösung im Doppelansatz je 1,0 ml und zusätzlich 1,0 ml Puffer (*a,b* oder *c*) in ein Reagenzglas pipettiert. Von den Standardlösungen werden ebenfalls 2,0 ml jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz in Reagenzgläser gegeben. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 50°C, 60°C bzw. 70°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf die jeweilige Temperatur zu erwärmen. Nach jeweils 0, 10, 20, 40, 60 und 120 min werden eine Probe und ein Probenblindwert (Doppelansatz) aus dem Wasserbad entnommen und auf Eis gestellt. Nachdem die 120 min-Proben entnommen worden sind, werden alle Proben und Probenblindwerte für weitere 30 min im Eisbad belassen.

#### **3.3.4.3.3 Standards und Proben - Schritt 2**

Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Dann wird in definierten Zeitabständen je 4,0 ml der Substratlösung (*d*) mit passendem pH-Wert hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Nach weiteren 60 min Inkubation werden die Proben dem Wasserbad entnommen und in wieder gleichen

Zeitabständen werden zu jeder Probe 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (i) hinzugegeben und gut gemischt. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

#### 3.3.4.3.4 Standard- und Probenblindwerte - Schritt 2

Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Anschließend werden die Proben dem Wasserbad entnommen und in definierten Zeitabständen werden je 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (i) hinzugegeben, gut gemischt und dann zu jeder Probe 4,0 ml Substratlösung (d) mit passendem pH-Wert hinzugegeben und gut gemischt. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

#### 3.3.4.3.5 Berechnung der Phytaseaktivität

Die Absorption aller Proben wird bei 415 nm photometrisch gemessen, nachdem der Nullpunkt für die Messung mittels Wasser festgelegt wurde.

Die Berechnung der Phytaseaktivität erfolgt nach dem in Abschnitt 3.3.4.1.5 beschrieben Modus.

#### 3.3.4.4 Bestimmung der Temperaturstabilität beim Pelletiervorgang

##### 3.3.4.4.1 Vorbereitung der Diäten

Einer Basaldiät für Broiler wurden die *E.coli*-Phytasen Optiphos und FB-Phytase jeweils in granulierter und pulverisierter Formulierung und die *Peniophora*-Phytase ZY in granulierter Form beigemischt, so dass ein Soll-Gehalt von 3000 FTU/kg Futter in den Diäten enthalten war. In Tabelle 5 ist die Zusammensetzung der Basaldiät dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Basaldiät

Komponente	[g/kg]
Mais	499,7
Sojaschrot	450
Sojaöl	20
Futterkalk	16
Premix, P-frei	10
Salz	3
DL-Methionin	1,3
Errechnet:	
Gesamtposphor	4,3
Kalzium	7,0

#### **3.3.4.4.2 Pelletierung**

Die fünf verschiedenen Diäten wurden in der institutseigenen Pelletieranlage bei Soll-Temperaturen von 55°C, 65°C, 75°C und 85°C (gemessen im Konditionierer der Anlage) pelletiert. Von jeder Fraktion wurde ein Teil abgenommen, der nicht pelletiert wurde. Dieser Teil diente bei der anschließenden Phytaseaktivitätsbestimmung als 100%-Wert.

Bei der Pelletieranlage handelt es sich um eine Versuchsanlage mit 400-600 kg Stundendurchsatz vom Hersteller Universal Milling Technology, Niederlande. Der Durchmesser der Matrizen-Bohrlöcher beträgt 2,5 mm.

#### **3.3.4.4.3 Bestimmung der Restphytaseaktivität nach dem Pelletiervorgang**

Nach dem Abkühlen wurden die Fraktionen einer Phytaseaktivitätsbestimmung unterzogen, wie im Abschnitt 3.3.1.4.3 beschrieben. Die Ergebnisse des Pelletierversuchs sind in Abschnitt 4.5.3, Tabelle 15 dargestellt.

#### **3.3.4.5 Bestimmung der Pepsinstabilität**

##### **3.3.4.5.1 Reagenzien**

Es werden die gleichen Reagenzien hergestellt, wie unter 3.3.4.1.1 beschrieben (*a-i*). Der pH-Wert der Enzymlösung (*e*) wird auf pH 2,0 eingestellt. Als Pufferlösung wird nur der Puffer mit dem optimalen pH-Wert des zu analysierenden Enzyms hergestellt. Die Substratlösung (*d*) wird auf den optimalen pH-Wert des Enzyms eingestellt. Die Standardlösung wird hergestellt, wie in Abschnitt 3.2.4.1.2 beschrieben. Zusätzlich werden folgende Reagenzien hergestellt:

*j) Salzsäure 0,1 mol (pH 2,0)*

50 ml Salzsäure 0,1 M wird mittels Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH 2,0 eingestellt.

*k) Pepsinlösung (3000 U/ml)*

59,06 mg Pepsin werden in 50 ml Salzsäure 0,1 M, pH 2,0 (*j*) gelöst und auf Eis gestellt.

##### **3.3.4.5.2 Analyse der Proben – Schritt 1**

Es wird von jeder Enzymlösung im Doppelansatz je 1,0 ml und zusätzlich 1,0 ml Pepsinlösung (*k*) in ein Reagenzglas pipettiert. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in einem Wasserbad mit 40°C 45 min inkubiert. Die Proben werden nach Ablauf dieser Zeit in ein Eisbad gestellt. 1,0 ml jeder Probe wird in ein Probengefäß pipettiert, mit 9,0 ml Puffer mit dem optimalen pH-Wert des entsprechenden Enzyms vermischt, der pH-Wert nochmals kontrolliert und ggf. korrigiert. 2,0 ml jeder Probe werden in ein neues Reagenzglas überführt.

### 3.3.4.5.3 Analyse der Standards und Proben - Schritt 2

Von den Standardlösungen werden 2,0 ml jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz in Reagenzgläser gegeben. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Proben- bzw. Standardinhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Dann wird in definierten Zeitabständen je 4,0 ml der Substratlösung (*d*) mit optimalem pH-Wert des Enzyms hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Nach weiteren 60 min Inkubation werden die Proben dem Wasserbad entnommen, in wieder gleichen Zeitabständen werden zu jeder Probe 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (*i*) hinzugegeben und gut gemischt. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

### 3.3.4.5.4 Standard- und Probenblindwerte

Es wird von jeder Enzymlösung im Doppelansatz je 1,0 ml und zusätzlich 1,0 ml Pepsinlösung (*k*) in ein Reagenzglas pipettiert. Von den Standardlösungen werden 2,0 ml jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz in Reagenzgläser gegeben und gut gemischt. 1,0 ml jeder Probe wird in ein Probengefäß pipettiert, mit 9,0 ml Puffer mit dem optimalen pH-Wert des entsprechenden Enzyms vermischt, der pH-Wert wird nochmals kontrolliert und ggf. korrigiert. 2,0 ml jeder Probe werden in ein neues Reagenzglas überführt. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Im Folgenden werden die Proben aus dem Wasserbad entnommen, in definierten Zeitabständen je 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (*i*) hinzugegeben, gut gemischt und dann werden zu jeder Probe 4,0 ml Substratlösung (*d*) mit optimalem pH-Wert des Enzyms hinzugegeben und gut gemischt. Nach 10 min Wartezeit werden alle Reagenzgläser 10 min bei 2600 x g zentrifugiert.

### 3.3.4.5.5 Berechnung der Phytaseaktivität

Die Absorption aller Proben wird bei 415 nm photometrisch gemessen, nachdem der Nullpunkt für die Messung mittels Wasser festgelegt wurde.

Die gemessene Absorption der Proben- und Standardblindwerte wird von dem Absorptionswert der Proben und Standards subtrahiert. Die Standardkurve (Absorptionsdifferenz / FTU/ml) wird mittels der sechs Standardwerte aufgestellt. Die Absorption der zu bestimmenden Proben wird mit Hilfe der Standardkurve abgelesen und daraus die relative Phytaseaktivität der Probe in % berechnet, indem der Wert der Absorption der Probe durch den des Blindwertes dividiert und dieses Ergebnis mit dem Faktor 100 multipliziert wird. Das Ergebnis stellt die Restaktivität des Enzyms in % dar.



### **3.3.4.6 Bestimmung der Pankreatinstabilität**

#### **3.3.4.6.1 Reagenzien**

Es werden die gleichen Reagenzien wie in Abschnitt 3.3.4.1.1 beschrieben hergestellt (*a-i*). Die Standardlösung wird hergestellt, wie in Abschnitt 3.2.4.1.2 beschrieben. Zusätzlich werden die folgenden Reagenzien hergestellt:

*j) Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) 0,1 mol (pH 7,0)*

50 ml Natriumhydrogencarbonat 0,1 mol werden mittels Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt.

*k) Pankreatinlösung (4,81 mg/ml)*

240,5 mg Pankreatin werden in 50 ml Natriumhydrogencarbonat 0,1 mol, pH 7,0 (*j*) gelöst und auf Eis gestellt.

#### **3.3.4.6.2 Analyse der Proben – Schritt 1**

Es wird von jeder Enzymlösung im Doppelansatz je 1,0 ml und zusätzlich 1,0 ml Pankreatinlösung (*k*) in ein Reagenzglas pipettiert. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in einem Wasserbad mit 40°C 45 min inkubiert. Die Proben werden nach Ablauf dieser Zeit in ein Eisbad gestellt. 1,0 ml jeder Probe wird in ein Probengefäß pipettiert, mit 9,0 ml Puffer mit dem optimalen pH-Wert des entsprechenden Enzyms vermischt, der pH-Wert nochmals kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. 2,0 ml jeder Probe werden in ein neues Reagenzglas überführt.

#### **3.3.4.6.3 Analyse der Standards und Proben – Schritt 2**

Von den Standardlösungen werden 2,0 ml jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz in Reagenzgläser gegeben. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Proben- bzw. Standardinhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Dann wird in definierten Zeitabständen je 4,0 ml der Substratlösung (*d*) mit optimalem pH-Wert des Enzyms hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Nach weiteren 60 min Inkubation werden die Proben aus dem Wasserbad entnommen, in wieder gleichen Zeitabständen zu jeder Probe 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (*i*) hinzugegeben und gut gemischt. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

#### **3.3.4.6.4 Standard- und Probenblindwerte**

Es wird von jeder Enzymlösung im Doppelansatz je 1,0 ml und zusätzlich 1,0 ml Pankreatinlösung (*k*) in ein Reagenzglas pipettiert. Von den Standardlösungen werden 2,0 ml jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz in Reagenzgläser gegeben und gut gemischt. 1,0 ml jeder Probe wird in ein Probengefäß pipettiert, mit 9,0 ml Puffer mit dem

optimalen pH-Wert des entsprechenden Enzyms vermischt, der pH-Wert nochmals kontrolliert und ggf. korrigiert. 2,0 ml jeder Probe werden in ein neues Reagenzglas überführt. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Im Folgenden werden die Proben aus dem Wasserbad entnommen, in definierten Zeitabständen je 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (*i*) hinzugegeben, gut gemischt und dann zu jeder Probe 4,0 ml Substratlösung (*d*) mit optimalem pH-Wert des Enzyms hinzugegeben und gut gemischt. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

### 3.3.4.6.5 Berechnung der Phytaseaktivität

Die Absorptionsmessung und Berechnung der Enzymaktivität wird durchgeführt wie in Abschnitt 3.3.4.5.5 beschrieben.

### 3.3.4.7 Effekt von Digestaüberstand aus Magen und Jejunum auf die Phytaseaktivität

#### 3.3.4.7.1 Herstellen der Digestaüberstandslösungen

Die verwendeten Digestaprobe wurden von einem Schwein gewonnen (Alter: 63 Tage, Gewicht: 24 kg). Das Tier wurde zuletzt 30 min vor der Tötung mit dem in Tabelle 6 aufgeführten Futter gefüttert. Es wurden der Mageninhalt sowie der Inhalt der proximalen Hälfte des Jejunums entnommen und die pH-Werte der Digesta gemessen. Jede Digestaprobe wird 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt, gut gemischt und der pH-Wert nochmals überprüft. Die Lösung muss den gleichen pH-Wert haben wie das Ausgangsmaterial. Es werden jeweils 1,5 ml in Eppendorfgefäße überführt und 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen und in 1,0 ml Portionen in Eppendorfgefäßen bei -20°C eingefroren.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Schweinediät

Bestandteile	%
Weizenschrot	69,59
Gerstenschrot	13,00
Sojaschrot (Typ 48)	10,91
Kohlensaurer Kalk	1,48
Monocalciumphosphat	1,54
Mineralvormischung*	1,20
Sojaöl	1,30
Lysin	0,36
Methionin	0,01
Tryptophan	0,04
Threonin	0,09
Viehsalz	0,36
Chromoxid	0,50

\*Mineralvormischung:

Gehalt an Inhaltsstoffen: 12,5 % Natriumchlorid, 5,0 % Magnesiumoxid

Gehalt an Zusatzstoffen (je kg): 400.000 I.E. Vitamin A, 40.000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>, 4.200 mg Vitamin E, 200 mg Vitamin K<sub>3</sub>, 200 mg Vitamin B<sub>1</sub>, 250 mg Vitamin B<sub>2</sub>, 400 mg Vitamin B<sub>6</sub>, 3.000 mcg Vitamin D<sub>12</sub>, 3.500 mg Nikotinsäure, 20.000 mcg Biotin, 100 mg Folsäure, 1.500 mg Ca-d-pantothenat, 80.000 mg CholinChlorid, 2.000 mg Eisensulfat, 1.200 mg Kupfersulfat, 5.000 mg Zinksulfat, 5.000 mg Manganoxid, 40 mg Kobaltsulfat, 50 mg Jod, 35 mg Natriumselenit

#### **3.3.4.7.2 Reagenzien**

Es werden die gleichen Reagenzien hergestellt wie unter 3.3.4.1.1 beschrieben (*a-i*). Es werden zwei Enzymlösungen (*e*) hergestellt und der pH-Wert auf die in der Digesta gemessenen Werte eingestellt. Als Pufferlösung wird nur der Puffer mit dem optimalen pH-Wert des zu analysierenden Enzyms hergestellt. Die Substratlösung (*d*) wird auf den optimalen pH-Wert des Enzyms eingestellt. Die Standardlösung wird, wie unter 3.3.4.1.2 beschrieben, zubereitet.

#### **3.3.4.7.3 Probenanalyse – Schritt 1**

Es wird von jeder Enzymlösung im Doppelansatz je 1,0 ml und zusätzlich 1,0 ml Digestaüberstandslösung in ein Reagenzglas pipettiert. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in einem Wasserbad mit 40°C 20 min inkubiert. Die Proben werden nach Ablauf dieser Zeit in ein Eisbad gestellt. 1,0 ml jeder Probe wird in ein Probengefäß pipettiert, mit 9,0 ml Puffer mit dem optimalen pH-Wert des entsprechenden Enzyms vermischt, der pH-Wert nochmals kontrolliert und ggf. korrigiert. 2,0 ml jeder Probe werden in ein neues Reagenzglas überführt.

#### **3.3.4.7.4 Standards und Proben - Schritt 2**

Von den Standardlösungen werden 2,0 ml jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz in Reagenzgläser gegeben. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Proben- bzw. Standardinhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Dann wird in definierten Zeitabständen je 4,0 ml der Substratlösung (*d*) mit optimalem pH-Wert des Enzyms hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Nach weiteren 60 min Inkubation werden in wieder gleichen Zeitabständen zu jeder Probe 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (*i*) hinzugegeben, gut gemischt und die Proben aus dem Wasserbad entnommen. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

#### **3.3.4.7.5 Standard- und Probenblindwerte**

Es wird von jeder Enzymlösung im Doppelansatz je 1,0 ml und zusätzlich 1,0 ml Digestaüberstandslösung in ein Reagenzglas pipettiert und gut gemischt. 1,0 ml jeder Probe wird in ein Probengefäß pipettiert, mit 9,0 ml Puffer mit dem optimalen pH-Wert des entsprechenden Enzyms vermischt, der pH-Wert nochmals kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. 2,0 ml jeder Probe werden in ein neues Reagenzglas überführt. Von den Standardlösungen werden 2,0 ml jeder Verdünnungsstufe im Doppelansatz in Reagenzgläser gegeben. Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt und dort für 5 min belassen, um die Probe auf 37°C zu erwärmen. Die Proben werden in definierten Zeitabständen aus dem Wasserbad entnommen, es werden je 4,0 ml Farb-Stopp-Lösung (*i*) hinzugegeben, gut gemischt, dann zu jeder Probe 4,0 ml Substratlösung (*d*) mit optimalem pH-Wert des Enzyms hinzugegeben und gut gemischt. Zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes werden alle Reagenzgläser 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g zentrifugiert.

### 3.3.4.7.6 Berechnung der Phytaseaktivität

Die Absorptionsmessung und Berechnung der Enzymaktivität wird durchgeführt wie in Abschnitt 3.3.4.5.5 beschrieben.

### 3.3.5 Bestimmung des Gesamtphosphorgehalts in Futtermittelproben oder Kotproben

Die im folgenden beschriebene Methode wird in Anlehnung an Taussky et al. (1953) angewandt.

#### 3.3.5.1 Reagenzien

##### a) Eichlösung (Kaliumdihydrogenphosphatlösung 1000 µg Phosphor/ml)

4,387 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in Wasser gelöst und auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt. Es wird eine Verdünnungsreihe aus dieser Eichlösung hergestellt.

##### b) Ammoniummolybdatlösung (10%)

100 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat werden in Wasser gelöst, nach dem Abkühlen 10 ml Ammoniak hinzugegeben und dann auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

##### c) Ammoniumvanadatlösung

2,35 g Ammoniummonovanadat werden in 400 ml warmem Wasser gelöst. Es werden 7,0 ml Salpetersäure mit 13 ml Wasser vermischt, zu der Lösung hinzugegeben und dann auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

##### d) Phosphor-Reagenz (Vanadat-Molybdat-Reagenz)

200 ml der Ammoniummolybdatlösung (b) und 200 ml der Ammoniumvanadatlösung (c) werden vermischt und dann langsam unter Rühren 134 ml Salpetersäure hinzugegeben. Die Lösung wird auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt und gut gemischt.

#### 3.3.5.2 Probelösung

2,0 g der gemahlene Probe (Futtermittel bzw. Kot) werden im Muffelofen bei 550°C verascht. Die Asche in den Tiegel wird mit 6,0 ml Salzsäure 37% versetzt und zudem die etwa dreifache Menge Wasser hinzugegeben. Die Tiegel werden dann für 40 - 50 min auf einem dampfenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Inhalt der Tiegel in 100 ml-Messkolben überführt und bis zur Markierung mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird anschließend durch einen Faltenfilter in eine Plastikflasche filtriert. Von dieser salzsauren Ausgangslösung (Einwaage: 2,0 g Probe /100 ml) werden für die Phosphorbestimmung in Futtermitteln 1,0 ml dieser Lösung abgenommen und für die Phosphorbestimmung im Kot 0,2 - 0,5 ml.

### **3.3.5.3 Ansätze für die Messung**

#### **3.3.5.3.1 Leerwert**

5,0 ml Phosphor-Reagenz (*d*) werden auf 20 ml mit Wasser aufgefüllt und gut gemischt.

#### **3.3.5.3.2 Verdünnungsreihe aus der Eichlösung**

Es werden 100, 200 und 400 µl der Eichlösung (*a*) abgenommen und jeweils 5,0 ml Phosphor-Reagenz (*d*) hinzugegeben. Jede Verdünnung wird auf 20 ml mit Wasser aufgefüllt und gut gemischt.

#### **3.3.5.3.3 Messlösung**

Zu 0,2 - 0,5 ml (bei Kotproben) bzw. zu 1,0 ml (bei Futtermittelproben) Probelösung werden 5,0 ml Phosphor-Reagenz (*d*) hinzugegeben. Dann wird auf 20 ml mit Wasser aufgefüllt und gut gemischt.

#### **3.3.5.4 Messung der Absorption**

Zunächst wird die Absorption der drei Verdünnungen aus der Eichlösung photometrisch bei 436 nm gegen den Leerwert bestimmt. Alle Probenlösungen werden zur Entwicklung des gelben Farbkomplexes 10 min stehengelassen und anschließend ebenfalls bei 436 nm im Photometer die Absorption gegen den Leerwert gemessen.

#### **3.3.5.5 Berechnung des Gesamtphosphorgehalts**

Die Standardkurve wird mittels der Standardwerte und dem Leerwert aufgestellt. Der Gesamtphosphorgehalt wurde nach folgender Gleichung berechnet:

Phosphorgehalt im Futtermittel bzw. Kot (mg/g) =  $(A \times B) / (C \times D) \times 1000$

A = Phosphor-Konzentration entsprechend der optischen Dichte (Extinktion)

B = Verdünnung der Probe (100)

C = Volumen der Probelösung, welches zur Herstellung der Messlösung verwendet wird (siehe 3.3.5.3.3)

D = Gewicht der ursprünglichen Probe (g)

### **3.3.6 Analyse der Inositolphosphate aus dem enzymatischen Abbau durch Phytasen**

Die Methode zur Analyse der Inositolphosphate wurde modifiziert nach Schlemmer et al. (2001) angewandt.

### 3.3.6.1 Bestimmung der Produkte aus dem enzymatischen Abbau einer einzelnen Phytase

#### 3.3.6.1.1 Reagenzien

##### a) Natriumacetatpuffer 200 mmol, pH 4,5 und 5,5

Es werden für jede Pufferlösung 16,4 g Natriumacetat und 0,147 g Calciumchlorid (1,0 mmol) in 800 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mittels Eisessig bzw. Natronlauge eingestellt und das Volumen auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

##### b) Tris-HCl-Puffer 200 mmol, pH 7,0

Es werden 15,76 g Tris-HCl und 0,0734 g Calciumchlorid (1,0 mmol) in 400 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mittels Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt und das Volumen auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

##### c) Substratlösung (pH 4,5, 5,5 und 7,0)

Es wird aus beiden Pufferlösungen (a) für pH-Wert 4,5 und 5,5 sowie aus Pufferlösung (b) für pH 7,0 eine passende Substratlösung hergestellt: 0,268 g Natriumphytat und 0,3 g bovines Serumalbumin werden in 80 ml der jeweiligen Pufferlösung (a oder b) gelöst, der pH-Wert mittels Eisessig oder Salzsäure bzw. Natronlauge auf den jeweiligen pH-Wert des Puffers eingestellt und dann mit dem entsprechenden Puffer (a oder b) auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösungen müssen täglich frisch hergestellt werden.

##### d) TCA-Stopp-Lösung (10% Trichloressigsäure)

25 g TCA werden in 250 ml Wasser gelöst.

##### e) Enzymlösungen 0,04 FTU/ml (Natuphos®, Optiphos und *Bacillus amyloliquefaciens*)

50 mg des granulierten Optiphos-Rohenzym (5000 FTU/g) und des granulierten Natuphos®-Rohenzym (5000 FTU/g) werden in je einen 25 ml-Messkolben gegeben und mit 25 ml Pufferlösung (a) im jeweils optimalen pH-Wert des Enzyms 60 min auf dem Magnetrührer gerührt und so gelöst. 1,0 ml des Überstandes jeder Lösung werden in je einen 25 ml-Messkolben gegeben und mit dem passenden Puffer (a) auf 25 ml aufgefüllt. 1,0 ml dieser Lösung wird wiederum abgenommen, in einen 10 ml-Messkolben überführt, mit der Pufferlösung (a) mit dem für das Enzym passenden pH-Wert auf 10 ml aufgefüllt und gut gemischt. Die *Bacillus amyloliquefaciens*-Phytase FZB45 wurde von der Arbeitsgruppe Bakteriengenetik des Instituts für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin zur Verfügung gestellt. Das gereinigte Enzym wurde in einer Lösung aus 20 mmol Natriumacetat und 300 mmol Natriumchlorid mit einem pH-Wert von 5,2 aufgenommen und anschließend in 100 µl-Portionen in Eppendorf-Gefäße überführt und gefriergetrocknet.

Diese 100µl des gefriergetrockneten Enzyms wurden in 3,0 ml Tris-HCl-Puffer (c) gelöst und für die weitere Analyse wird diese Enzymlösung verwendet.

Die so erhaltenen Probenlösungen haben eine Phytaseaktivität von 0,04 FTU/ml.

### 3.3.6.1.2 Analyse

#### 3.3.6.1.2.1 Nullproben

Es werden für jedes der zu prüfenden Enzyme im Doppelansatz 1,0 ml Wasser, 1,0 ml Substratlösung (c) und 1,0 ml TCA-Stop-Lösung (d) in ein Reagenzglas gegeben und gut vermischt. Die Proben werden 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g für 10 min zentrifugiert.

#### 3.3.6.1.2.2 Probenvorbereitung

Es werden für jedes der zu prüfenden Enzyme im Doppelansatz 1,0 ml der entsprechenden Optiphos- Natuphos®- oder *Bacillus*-Enzymlösung (e) und 1,0 ml Substratlösung (c) in ein Reagenzglas gegeben und gut vermischt.

Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt. Nach jeweils 15, 45, 90 und 120 min werden die Proben (Doppelansatz) aus dem Wasserbad entnommen, jeweils 1,0 ml TCA-Stop-Lösung (d) hinzugegeben, gut gemischt und 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g für 10 min zentrifugiert.

#### 3.3.6.1.2.3 Inositolphosphatanalyse

Aus jeder Probe und jeder Nullprobe wird nach dem Zentrifugieren 1,0 ml des Überstandes in je ein Probengläschen für die HPLC-Messung überführt und anschließend die Inositolphosphatbestimmung mittels HPLC durchgeführt. Inositolphosphate besitzen keine chromophore Gruppe und sind daher nicht direkt photometrisch nachweisbar. Die Detektion der Inositolphosphate erfolgt daher mittels HPLC gekoppelt an eine Nachsäulenderivatisierung. Die vorbereitete Probe wird über einen Autosampler auf eine Mono-Q-Säule aufgetragen (Flussrate 1,0 ml/min). Die unterschiedlich phosphorylierten Inositolphosphate werden von der Säule mit einem optimierten pH-Gradienten eluiert (0,005 mol bis 0,5 mol HCl). Das Eluat wird in einem Verhältnis von zwei Teilen Eluat auf einen Teil Nachsäulenderivatisierungs-Reagenz (1,0 g  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  in 100 ml 0,33 mol  $\text{HClO}_4$ ) gemischt und die Extinktion des Gemisches bei 290 nm gemessen. Zur Datenaufnahme und anschließenden Auswertung wird die Software Chromeleon (Dionex) verwendet.

### 3.3.6.2 Bestimmung der Produkte aus dem sequentiellen Abbau einer *E.coli*-Phytase und einer *Bacillus*-Phytase

#### 3.3.6.2.1 Reagenzien

##### a) Natriumacetatpuffer 200 mmol, pH 4,5

Es werden 4,1 g Natriumacetat und 0,147 g Calciumchlorid (1,0 mmol) in 800 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mittels Eisessig bzw. Natronlauge eingestellt und das Volumen auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

##### b) Tris-HCl-Puffer 50 mmol, pH 7,0

Es werden 7,88 g Tris-HCl und 0,147 g Calciumchlorid (1,0 mmol) in 800 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mittels Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt und das Volumen auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

*c) Tris-HCl-Puffer 1 mol, pH 9,5*

Es werden 39,4 g Tris-HCl und 0,0367 g Calciumchlorid (1,0 mmol) in 150 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mittels Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt und das Volumen auf 250 ml mit Wasser aufgefüllt.

*d) TCA-Stop-Lösung (10% Trichloressigsäure)*

25 g TCA werden in 250 ml Wasser gelöst.

*e) Substratlösung (pH 4,5)*

Die Lösung wird wie unter 3.3.6.1.1 beschrieben hergestellt.

*f) Enzymlösung Optiphos (0,04 FTU/ml)*

Die Lösung wird wie unter 3.3.6.1.1 beschrieben hergestellt.

*g) Enzymlösung Bacillus-Phytase*

Die Lösung wird wie unter 3.3.6.1.1 beschrieben hergestellt.

### **3.3.6.2.2 Nullproben**

Durchführung wie unter 3.3.6.1.2.1 beschrieben.

### **3.3.6.2.3 Probenvorbereitung**

Es werden drei Doppelansätze gefertigt. Je Ansatz werden 1,0 ml der Enzymlösung Optiphos (*f*) und 1,0 ml Substratlösung (*e*) in ein Reagenzglas pipettiert und gut gemischt.

Die Reagenzgläser mit je 2,0 ml Probeninhalt werden in definierten Zeitabständen in ein Wasserbad mit 37°C gestellt. Nach 60 min werden alle Proben aus dem Wasserbad genommen. Zu einer Probe (Doppelansatz) wird jeweils 1,0 ml TCA-Stop-Lösung (*d*) hinzugegeben, gut gemischt, 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g für 10 min zentrifugiert.

Zu den anderen beiden Doppelansätzen werden je 180 µl des Tris-HCl-Puffers (*c*) gegeben, gut vermischt und der pH-Wert mit einem pH-Meter gemessen. Der pH-Wert soll etwa pH 7,0 betragen. Anschließend werden 100 µl der Enzymlösung *Bacillus-Phytase* (*g*) zu jeder Probe hinzugegeben, gut vermischt und eine Doppelprobe weitere 45 min bei 37°C, die andere nochmals 90 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach dieser Inkubationsdauer wird zu jeder Probe 1,0 ml TCA-Stop-Lösung (*d*) hinzugegeben, gut gemischt, die Proben 10 min stehengelassen und anschließend bei 2600 x g für 10 min zentrifugiert.

### **3.3.6.2.4 Inositolphosphatanalyse**

Durchführung wie unter 3.3.6.1.2.3 beschrieben.



### 3.3.7 Effizienz von Optiphos auf Gesundheit, Leistung und P- und Ca-Verdaulichkeit bei Absetzferkeln

#### 3.3.7.1 Versuchsprinzip und -ziel

Diese Studie wurde konzipiert, um den dosisabhängigen Effekt von Optiphos in den hauptsächlich aus Mais und Optigrain bestehenden Diäten für Ferkel zu bestimmen. Die Diäten hatten eine marginale Ca- und P- Versorgung und wurden während der sechswöchigen Fütterungsperiode ohne oder mit Phytasesupplementierung zu der Basaldiät mit den Enzymen Optiphos (bakterieller Ursprung aus *E.coli*) und Natuphos® (pilzlicher Ursprung aus *Aspergillus niger*) in Dosierungen von 125, 250, 500 und 1000 FTU/kg Futter verabreicht. Das Fütterungsexperiment hatte zum Ziel, die Effizienz der bakteriellen *E.coli*-Phytase in abgestuften Konzentrationen auf verschiedene Leistungsparameter im Vergleich zur pilzlichen Phytase oder der Negativkontrolle ohne Enzymsupplementierung einschätzen zu können. Die untersuchten Leistungsparameter waren Wachstum, Gewichtszunahme, Futteraufwand, Kotkonsistenz sowie die scheinbare Verdaulichkeit mit Fokus auf Kalzium, Phosphor und die Rohasche.

#### 3.3.7.2 Tiere und Unterbringung der Tiere

Es wurden insgesamt 54 Ferkel (Vaterlinie: Pietrain, Mutterlinie: Euroc x Landrasse) nach dem Absetzen am 24. Lebenstag bis zum 65. Lebenstag für die Fütterungsversuche verwendet. Die Hälfte der Tiere war männlich (kastriert), die andere Hälfte weiblich. Die Ferkel wurden auf 27 Flat-Deck-Laufställe verteilt (zwei Ferkel je Laufstall) und wurden entsprechend ihres Gewichts, Geschlechts und Wurfes gleich auf die Gruppen verteilt. Jede Gruppe bestand aus sechs Ferkeln und drei Wiederholungen. Die je Laufstall zugeteilte, vorab gewogene Menge an Futter wurde in automatischen Trögen verabreicht. Die Tröge waren so konstruiert, dass Futtermittelverlust maximal begrenzt war. Trinkwasser aus Tränken stand kontinuierlich zur Verfügung. Der Stall war künstlich beleuchtet, Tageslicht war zwölf Stunden lang vorhanden. Die Raumtemperatur wurde bei  $21,5 \pm 1,2$  °C gehalten. Die relative Luftfeuchtigkeit im Stall betrug  $60 \pm 10$  %.

#### 3.3.7.3 Versuchsplan

Die Details des Versuchsplanes sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Versuchsplan

Gruppe		A	B	C	D	E	F	G	H	I
Optiphos	FTU/kg	-	125	250	500	1000	-	-	-	-
Natuphos®	FTU/kg	-	-	-	-	-	125	250	500	1000
Ferkel	n	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Wiederholung	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3

### 3.3.7.4 Diäten

Nach dem Absetzen wurde ein Ferkelstarterfutter verabreicht, welches so kalkuliert war, dass der Bedarf an umsetzbarer Energie (ME) und allen Nährstoffen außer Kalzium und Phosphor entsprechend den Empfehlungen für Ferkel der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie gedeckt war (GfE, 2006). Die Hauptkomponenten der Ration waren Mais, Optigrain (hitzebehandeltes Getreide: 50 % Weizen, 25 % Gerste und 25 % Mais) und Sojaschrot. Das Ferkelfutter enthielt 19,97 % Rohprotein, 1,15 % Lysin und 13,56 MJ ME<sub>BFS</sub> je kg. Entsprechend der in Deutschland offiziell verwendeten Methode ist die Phosphorverdaulichkeit nur dann eine zuverlässige Maßeinheit für den verfügbaren Phosphor, wenn diese unter suboptimaler Phosphorversorgungslage bestimmt wird. Die Basaldiät war so konzipiert, dass der Gehalt an verdaulichem Phosphor sowohl in den Rationen ohne Phytasezusatz, als auch in denen mit Phytasezusatz nicht den Nettobedarf an verdaulichem Phosphor für das Wachstum überschreitet. Für diese Kalkulation wurde vorausgesetzt, dass die maximale Phosphorverdaulichkeit der phytasesupplementierten Diäten bei 70% liegt. Darüber hinaus lagen in den Diäten bis zu 80% des gesamten Phosphats gebunden als Phytinphosphor vor. Der Gehalt an Ca und P in der Basaldiät lag mit 7,0 g und 3,5 g je kg Futter (Phytat-P: 2,8 g/kg) unterhalb der Empfehlungen von 8,25 g Ca und 2,84 g verdaulichem P je kg Futter. Die Empfehlungen gelten für Ferkel in den ersten sechs Wochen nach dem Absetzen mit einer durchschnittlichen Körpergewichtszunahme und einer Futterraufnahme von 500-800 g pro Ferkel und Tag. Die Basaldiät enthielt außer Aminosäuren, Spurenelementen und Vitaminen keine weiteren Futterzusatzstoffe. Die Zusammensetzung der Basaldiät und deren Nährstoffgehalt sind in den Tabellen 8 und 9 aufgeführt.

Die Basaldiät mit geringem Ca- und P-Gehalt wurde für die Fütterungsversuche entweder als Negativkontrolle verwendet oder mit Optiphos bzw. Natuphos® in gestaffelten Levels supplementiert. Die Basaldiät wurde in einer Partie gemischt und anschließend für die Enzymzugabe von Optiphos und Natuphos® in gleiche Portionen aufgeteilt. Es wurde soviel Enzym eingemischt, dass schließlich die beabsichtigte Menge von 1300 FTU/kg Futter enthalten war. Zusätzlich wurden 0,5 % Chromoxid (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) als inerte Marker zu allen Diäten hinzugemischt. Die Basaldiät sowie die enzymesupplementierten Diäten wurden anschließend bei 50°C (gemessen im Konditionierer) pelletiert. Dies entspricht einer Temperatur von etwa 60°C in der Matrice der Pelletieranlage.

Um die Aufnahme der Diäten mit den beabsichtigten Phytaseaktivitäten von 125, 250, 500 und 1000 FTU/kg der Enzyme Optiphos und Natuphos® zu gewährleisten, wurden die Basaldiäten mit und ohne Phytasesupplementierung täglich für jede einzelne Gruppe zubereitet. Zu der entsprechend kalkulierten Menge an phytasesupplementierter Basaldiät wurde eine entsprechend kalkulierte Menge der nicht-phytasesupplementierten Basaldiät gemischt. Diesen Berechnungen lagen die analysierten Phytaseaktivitäten zugrunde. Die täglich je Gruppe gefütterte Menge der Diäten wurde jeweils am Vortag aus der Gesamtfutterraufnahme je Gruppe unter Berücksichtigung eventueller Futterreste und -verluste berechnet. Wenn sich Restmengen von mehr als 100 g Futter in den Trögen befanden, wurde die verabreichte Menge Futter am Folgetag konstant gehalten.

Tabelle 8: Bestandteile der Basaldiät

Bestandteile der Basaldiät	%
Mais	41,46
Optigrain	25,00
Sojaschrot	22,00
Zuckerrübenschnitzel	5,00
Kartoffelprotein	2,70
Futterkalk	1,49
Premix*	1,20
Sojaöl	1,00
Lysin	0,11
Methionin	0,03
Tryptophan	0,01

\*Premix:

Gehalt per kg:

400.000 I.E. Vitamin A, 40.000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>, 4.200 mg Vitamin E, 200 mg Vitamin K<sub>3</sub>, 200 mg Vitamin B<sub>1</sub>, 250 mg Vitamin B<sub>2</sub>, 400 mg Vitamin B<sub>6</sub>, 3500 mg Niacin, 3.000 µg Vitamin B<sub>12</sub>, 20.000 µg Biotin, 150 mg Folsäure, 1.500 Panthothensäure, 80.000 mg Cholinchlorid, 2.000 mg Fe, 1.200 mg Cu, 5.000 mg Zn, 5.000 mg Mn, 40 mg Co, 50 mg J, 35 mg Se, 125 g Na

Tabelle 9: Nährstoffe in der Basaldiät

Nährstoffe in der Basaldiät (errechnete Konzentration)	g/kg
MEBFS [MJ/kg]	13,52
Rohprotein	199,70
Rohfaser	33,60
Rohfett	36,50
Stärke	404,60
Zucker	36,60
Kalzium	7,00
Phosphor	3,50
Phytat-P	2,70
Natrium	1,80
Lysin	11,50
Methionin	3,50
Cystin	3,60
Threonin	8,10
Tryptophan	2,30

### 3.3.7.5 Parameter

#### 3.3.7.5.1 Leistung

Am ersten Tag des Experiments sowie am letzten Tag jeder Versuchswoche wurde das durchschnittliche Körpergewicht und die im Futtertrog verbliebene Menge Futter ermittelt. Die Gewichtszunahme wurde berechnet aus dem am Ende jeder Versuchswoche ermittelten durchschnittlichen Körpergewicht abzüglich des durchschnittlichen Körpergewichts, welches je Laufstall am Beginn der Woche ermittelt wurde. Der periodische Futterverbrauch je Ferkel wurde errechnet als die tägliche Gesamtmenge des je Box und Zeitabschnitt verabreichten Futters (abzüglich der Verluste) dividiert durch die Anzahl der Ferkel in der Box. Der Futteraufwand jeder Box wurde errechnet, indem der Futterverbrauch durch die Gesamtgewichtszunahme (Durchschnitt zweier Ferkel) je Periode geteilt wurde.

### 3.3.7.5.2 Gesundheitsstatus und Konsistenz der Fäzes

Der Gesundheitsstatus und die Mortalität der Ferkel wurden täglich aufgezeichnet. Vom ersten Tag des Experiments an wurde des Weiteren das Aussehen der Fäzes nach folgenden Kategorien beurteilt:

- 1 = fest
- 2 = weich geformt
- 3 = weich ungeformt
- 4 = ungeformt (> 2 Tage)
- 5 = wässrig (> 2 Tage)

### 3.3.7.5.3 Scheinbare Ca- und P-Verdaulichkeit

Chromoxid ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , 5 g/kg Futter) wurde als inerte, unverdauliche Marker für die fäkale Verdaulichkeit eingesetzt. Fäzesproben von allen Ferkeln wurden rektal in Abständen von 24 Stunden vom 40. bis zum 45. sowie vom 60. bis zum 65. Versuchstag genommen. Alle Proben wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert und anschließend lysophilisiert und gemischt. Der Phosphorgehalt der Proben wurde untersucht wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben. Die scheinbare Verdaulichkeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Verdaulichkeit (\%)} = 100 - \left[ \frac{\% \text{ Indikator im Futter}}{\% \text{ Indikator in den Fäzes}} \times \frac{\% \text{ Nährstoff in den Fäzes}}{\% \text{ Nährstoff im Futter}} \right] \times 100$$

### 3.3.7.6 Analysen

Die Basaldiäten mit und ohne Phytasesupplementierung wurden auf die Nährstoffgehalte Trockenmasse, Rohfaser, Rohprotein, Rohasche, Stärke, Gesamtzuckergehalt, Calcium, Phosphor und Natrium gemäß der Standard-Methode des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) untersucht (Naumann und Bassler, 1976). Die Phytaseaktivität im Futter wurde nach der Methode von Engelen et al. (1994) bestimmt.

### 3.3.7.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Test (mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors) auf Normalverteilung überprüft. Alle Daten wurden einer einfaktoriellem Varianzanalyse (engl. analysis of variance, ANOVA) unterzogen. Die Gruppenschnittwerte wurden durch Anwendung geeigneter Durchschnittsvergleichstests (Scheffe-Test, Tukey Test) verglichen und das Signifikanzlevel auf  $P < 0,05$  gesetzt. Die Regressionsgeraden stellen die Beziehung zwischen einer abhängigen und einer unabhängigen Variable dar. Die unabhängige Variable wird dabei auf der x-Achse abgetragen, die abhängige Variable auf der y-Achse. Mit Hilfe der Regressionsgeraden wird der Einfluss der Enzymsupplementierung auf unterschiedliche Leistungsparameter dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Aktivitätsbestimmung der Phytase-Rohwaren nach der AOAC-Methode

Die Phytaseaktivität der Enzyme wurde nach der offiziellen AOAC-Methode (Engelen et al., 1994) bestimmt. Die vom Hersteller deklarierte Aktivität wurde auf diese Weise überprüft. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 10: Aktivität der Phytase-Rohwaren bestimmt nach der AOAC-Methode

	Natuphos	ZY-Phytase	Optiphos Pulver	Optiphos Granulat	FB-Phytase Pulver	FB-Phytase Granulat
<b>Deklarierte Aktivität FTU/g</b>	5000	5000	8850	4302	5000	5000
<b>Analysierte Aktivität FTU/g</b>	6850	6160	18600	8640	3540	4440

Mit Ausnahme der FB-Phytase lagen alle analysierten Aktivitäten deutlich über den vom Hersteller deklarierten Angaben, bei Optiphos etwa doppelt so hoch.

### 4.2 Aktivitätsbestimmung der Optiphos-Rohware nach der United Feeds-Methode

Bei dieser vom Hersteller (United Feeds) empfohlenen Methode wird die Phytase-Reaktion durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) gestoppt und die Menge freigesetzten Phosphors in einem zweiten Schritt spektrophotometrisch gemessen. Das von der Optiphos-Phytase freigesetzte Phosphat bildet einen blauen Phosphomolybdat-Komplex mit einem maximalen Absorptionskoeffizienten bei 820 nm. Das Ergebnis der Messung ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Aktivität der Optiphos-Rohware bestimmt nach der United Feeds-Methode

	Optiphos Granulat
<b>Deklarierte Aktivität FTU/g</b>	4302
<b>Analysierte Aktivität FTU/g</b>	5855

### 4.3 Aktivitätsbestimmung der FB-Phytase-Rohware nach der FB-Molybdat-Blau-Methode

Bei dieser vom Hersteller (Fuda Biotech) empfohlenen Methode handelt es sich um die Bestimmung der Phytaseaktivität basierend auf der kolorimetrischen Quantifizierung (bei 700nm) von durch Phytathydrolyse freigesetztem Phosphor unter Verwendung von Ammoniummolybdat als Farbreagenz. Das Ergebnis der Messung ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Aktivität der FB-Phytase-Rohware bestimmt nach der FB-Molybdat-Blau-Methode

	FB-Phytase Pulver	FB-Phytase Granulat
<b>Deklarierte Aktivität FTU/g</b>	5000	5000
<b>Analysierte Aktivität FTU/g</b>	3960	4570

#### 4.4 Charakterisierung der Phytasen

##### 4.4.1 pH-Verhalten

Das pH-Verhalten der Phytasen wurde bestimmt, indem die Enzyme Lösungen mit unterschiedlichsten pH-Werten ausgesetzt wurden. Das pH-Verhalten von Natuphos®, Optiphos und FB-Phytase ist in Abbildung 9 dargestellt, die pH-Optima der drei Enzyme in Tabelle 13.

Tabelle 13: pH-Optima

	Natuphos®	Optiphos Granulat	FB-Phytase Granulat
<b>pH-Optimum</b>	5,5	4,5	5,0

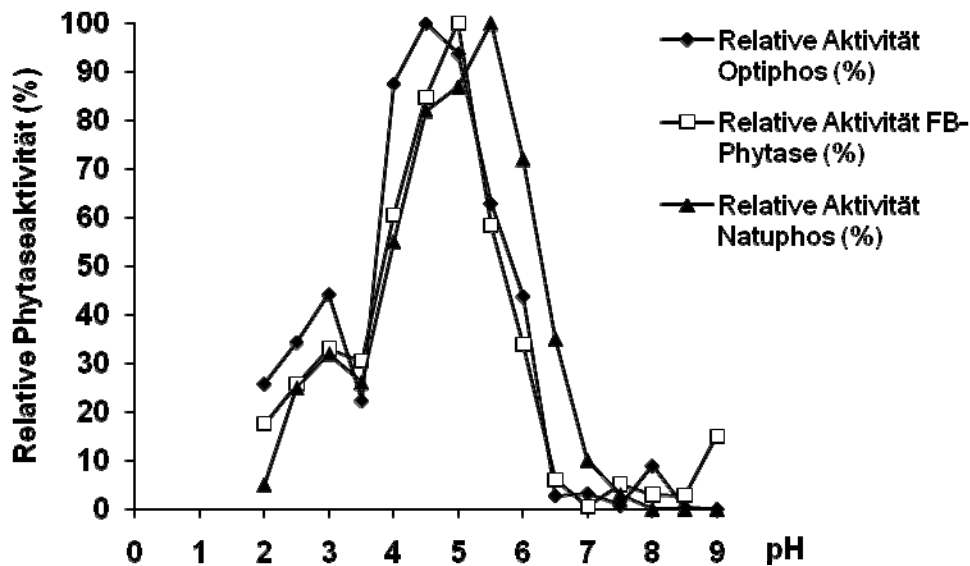


Abbildung 9: pH-Verhalten

Die drei Phytasen zeigen ihr pH-Optimum alle bei unterschiedlichen Werten, jedoch haben die Enzyme alle gemeinsam, dass ihre Aktivität ab einem pH von 6,0 rapide abnimmt. Bei neutralem pH 7,0 hat die Natuphos®-Phytase noch 10% ihrer Aktivität, Optiphos und FB-Phytase jedoch nur noch 3,2% bzw. 0,4%. Demgegenüber steht eine höhere Aktivität der beiden letzteren Enzyme in saurem pH.

Bei pH 2,0 weisen Optiphos und FB-Phytase Aktivitäten von 25,8% respektive 17,4% auf und Natuphos eine Aktivität von etwa 5% der maximal möglichen Aktivität.

**4.5 Temperaturverhalten**

**4.5.1 Temperaturoptimum**

Das Temperaturoptimum wurde ermittelt, indem die Enzyme bei acht unterschiedlichen Temperaturen in Natriumacetatpuffer mit dem für das jeweilige Enzym optimalen pH-Wert für 60 Minuten inkubiert wurden.

Das Temperaturverhalten von Optiphos, FB-Phytase und Natuphos wird in Abbildung 10 dargestellt, die Temperatur-Optima in Tabelle 14.

Tabelle 14: Temperaturoptima

	Natuphos®	Optiphos Granulat	FB-Phytase Granulat
Temperaturoptimum (°C)	50	55	55

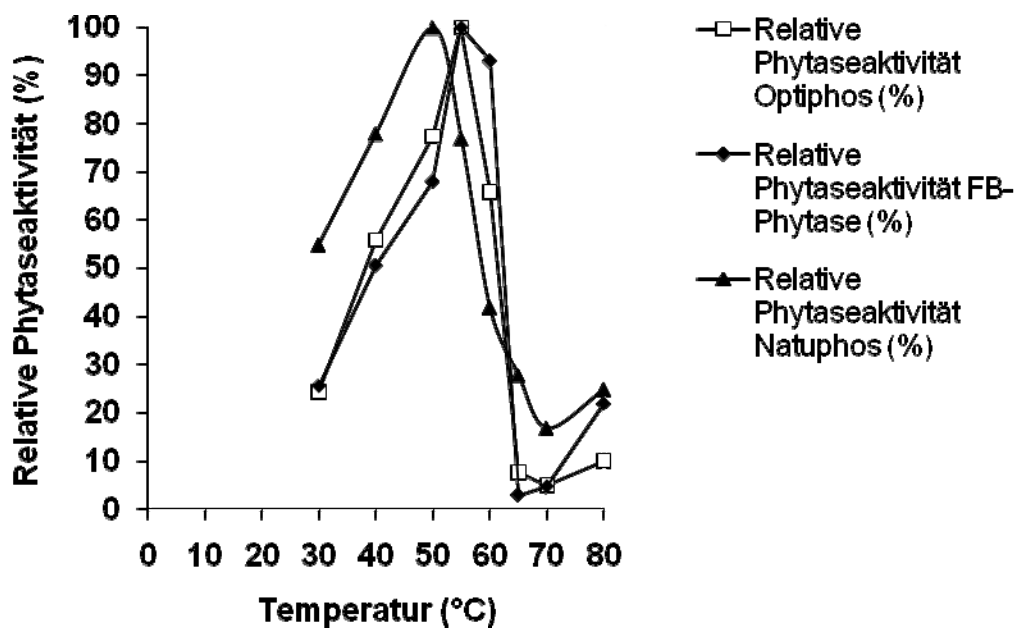


Abbildung 10: Temperaturverhalten

Die *E.coli*-Phytasen Optiphos und FB-Phytase weisen ihr Temperaturoptimum bei einer höheren Temperatur auf als die pilzliche Natuphos®-Phytase. Alle drei Phytasen haben Temperaturoptima zwischen 50°C und 55°C.

Bei höheren Temperaturen nimmt die Aktivität der beiden bakteriellen Phytasen schneller ab, als dies bei Natuphos® der Fall ist. So hat die pilzliche Phytase bei 65°C eine Aktivität von 28%, die bakteriellen Phytasen Optiphos und FB liegen hier bei unter 10%. Bei einer Temperatur von 80°C ist bei allen drei Phytasen noch ein geringer Anstieg der Aktivität zu verzeichnen.

#### 4.5.2 Temperaturstabilität in wässriger Lösung

Die Temperaturstabilität der Phytasen wurde für drei unterschiedliche Temperaturen und jeweils für eine Gesamtdauer von 120 Minuten bestimmt. Bei den Enzympräparaten handelte es sich um Granula. Die Enzyme wurden in Natriumacetatpuffer mit dem jeweils optimalen pH-Wert inkubiert. Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen die relativen Phytaseaktivitäten der Phytase-Präparate nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten bei 50°C, 60°C und 70°C.

Hierbei ist zu erkennen, dass Optiphos schon bei 20-minütiger Inkubation bei 50°C nur noch unter 10% Aktivität aufweist, die Vergleichsenzyme FB-Phytase und Natuphos® hingegen etwa 60% bzw. 80% Restaktivität aufzeigen. Bei einer Inkubationstemperatur von 60°C hat nur Natuphos eine Restaktivität von 30 - 50%, je nach Dauer der Inkubation, die *E.coli*-Phytasen weisen nur Restaktivitäten von 0 - 10% auf. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch bei der 70°C-Inkubation. Hier zeigt das pilzliche Enzym Restaktivitäten von 3 - 50%, je nach Verweildauer im wässrigen Medium. Die bakteriellen Phytasen verhalten sich auch hier instabil.

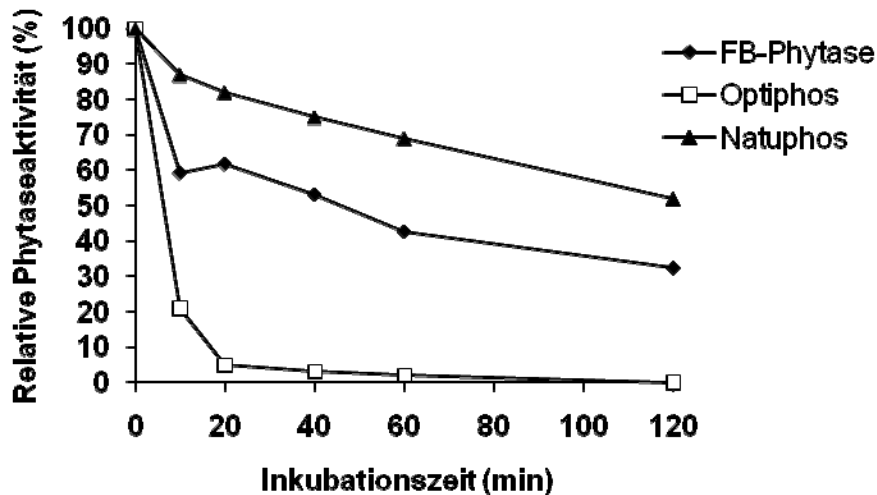


Abbildung 11: Temperaturstabilität bei 50°C



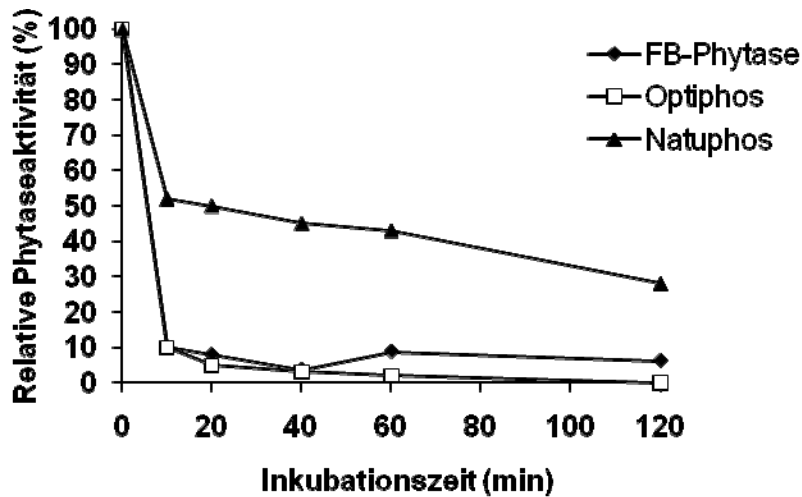


Abbildung 12: Temperaturstabilität bei 60°C

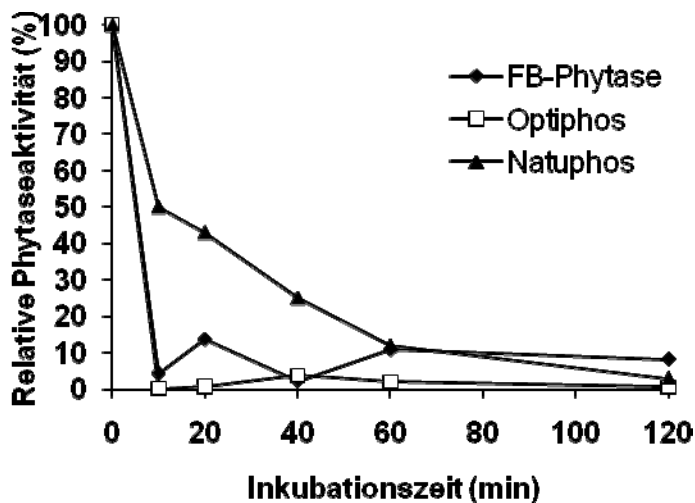


Abbildung 13: Temperaturstabilität bei 70°C

#### 4.5.3 Temperaturstabilität beim Pelletiervorgang

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse des in Abschnitt 3.3.4.4 beschriebenen Pelletierversuchs dargestellt. Alle supplementierten Phytasen wurden beim Pelletiervorgang vier unterschiedlichen Temperaturen (siehe Spalte 3) ausgesetzt. In Spalte 6 ist die nach dem Pelletieren festgestellte Restaktivität (bezogen auf die unpelletierte Probe) der Phytasen in Prozent dargestellt.

Alle getesteten Phytasen wiesen bei der ersten Temperaturstufe (ca. 55°C) noch Restaktivitäten von um die 80% auf. Bei ca. 65°C hatte das Optiphos-Granulat mit 97% die höchste Restaktivität und auch bei den nächsten Stufen (75°C und 85°C) lag dieses Enzym nach dem Vergleichsenzym ZY-Phytase mit einer Restaktivität von 72% bzw. 77% deutlich über den Werten der anderen Enzyme.

Tabelle 15: Ergebnisse der Temperaturstabilität beim Pelletiervorgang

Proben- Nr.	Supplementierte Phytase	Pelletiertemp. (°C)	Soil FTU/kg	Ist FTU/kg	*Restaktivität in %
1	ZY- Phytase	0	3000	4353	100
2		60,3	3000	3712	85
3		66,8	3000	3417	78
4		73,9	3000	3791	87
5		81,9	3000	4192	96
6	Optiphos (Pulver)	0	3000	6374	100
7		56,7	3000	5455	86
8		66,3	3000	3989	63
9		75,4	3000	2214	35
10		86,3	3000	448	7
11	Optiphos (Granulat)	0	3000	7777	100
12		57,7	3000	6593	85
13		64,5	3000	7579	97
14		74,0	3000	5569	72
15		85,3	3000	6021	77
16	FB-Phytase (Pulver)	0	3000	3641	100
17		56,1	3000	2819	77
18		65,9	3000	2331	64
19		75,8	3000	1457	40
20		86,2	3000	-337	0
21	FB-Phytase (Granulat)	0	3000	3848	100
22		54,8	3000	3045	79
23		65,4	3000	3074	80
24		75,8	3000	1774	46
25		85,7	3000	-241	0

\*= Restaktivität bezogen auf die unpelletierte Probe (=100%)

#### 4.6 Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen

##### 4.6.1 Stabilität gegenüber Pepsin und Pankreatin

Die Phytasepräparate wurden für 20 Minuten in wässriger Pepsin- bzw. Pankreatinlösung bei 40°C inkubiert, um die Widerstandsfähigkeit der Enzyme gegen Proteasen zu prüfen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Restaktivität (%) der Phytasepräparate nach 20 min. Inkubation bei 40°C in wässriger Pepsin- bzw. Pankreatinlösung

Phytasepräparat	Pepsin	Pankreatin
Natuphos®	30,6	18,0
Optiphos	56,4	54,3
FB-Phytase	73,8	36,4

Die Ergebnisse zeigen, dass die pilzliche *Aspergillus*-Phytase gegenüber den bakteriellen *E.coli*-Phytasen im wässrigen Medium mit Verdauungsenzymen deutlich unterlegen ist. Während Natuphos® nach Inkubation im Pepsin-Medium nur etwa 30% Restaktivität aufweist, konnte bei Optiphos noch über die Hälfte und bei der FB-Phytase noch fast 74% der ursprünglichen Aktivität nachgewiesen werden.

Auch nach Inkubation mit Pankreatinlösung wies die *Aspergillus*-Phytase nur eine Restaktivität von 18% auf. Die FB-Phytase hatte bei diesem Versuch noch etwa ein Drittel und Optiphos etwa die Hälfte der ursprünglichen Aktivität.

#### 4.6.2 Effekt von Digestaüberstand auf die Phytaseaktivität

Die Digesta aus Magen und proximalen Jejunumabschnitten eines Schweines wurde entnommen und deren pH-Wert überprüft. Die pH-Werte sind in Tabelle 17 abzulesen. Die nach 60-minütiger Inkubation in 40°C warmen Digestaüberständen verbleibende Restaktivität der Phytasen in Prozent ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 17: In der Digesta gemessene pH-Werte

Segment des Verdauungstraktes	pH-Wert (gemessen in der Digesta)
Magen	5,05
Proximales Jejunum	6,34

Tabelle 18: Restaktivität (%) der Phytasepräparate nach 60 min Inkubation bei 40°C in wässriger Digestaüberstandslösung\* aus Magen und proximalem Jejunum

Phytasepräparat	Digesta Magen	Digesta prox. Jejunum
Natuphos®	97,8	70,4
Optiphos	100,4	35,1
FB-Phytase	101,4	38,0

\* Der Inhalt des Verdauungstraktes (Magen und prox. Jejunum vom Schwein) wurde 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt, gut vermischt und zentrifugiert. Die Überstände wurden zurückgewonnen und die pH-Werte entsprechend der ursprünglichen pH-Werte der entsprechenden Segmente des Verdauungstraktes eingestellt.

Es wird deutlich, dass sowohl die pilzliche als auch die bakteriellen Phytasen in Magendigesta mit einem pH von 5,05 stabil sind. In der Jejunaldigesta hingegen zeigt nur die Natuphos®-Phytase mit 70,4 % Restaktivität noch eine gewisse Stabilität, die *E.coli*-Phytasen haben nach Inkubation in der Digesta mit pH 6,34 nur noch 35,1% (Optiphos) bzw. 38,0% (FB-Phytase) Restaktivität.

#### 4.6.3 Produkte aus dem enzymatischen Abbau einer einzelnen Phytase

Die Nullproben, bestehend aus 1,0 ml Wasser, 1,0 ml Substratlösung (c) und 1,0 ml TCA-Stopp-Lösung (d) (siehe Abschnitt 3.3.6.1.2.1) wurden nach dem Zentrifugieren der Inositolphosphatbestimmung mittels HPLC unterzogen. Das Chromatogramm zeigt zwei Peaks, wobei es sich bei Peak 2 (Retentionszeit 19,387 min) um IP6 handelt und bei Peak 1 (Retentionszeit 1,11 min) um eine nicht definierte Substanz, die auch auf den im Folgenden dargestellten Chromatogrammen auftaucht. Möglicherweise handelt es sich um ein IP2, IP1 oder um freies Phosphat. Dies konnte jedoch nicht analysiert werden. Das Chromatogramm einer solchen Nullprobe und die zugehörige Peak-Analyse sind in Abbildung 14 und Tabelle 19 dargestellt.

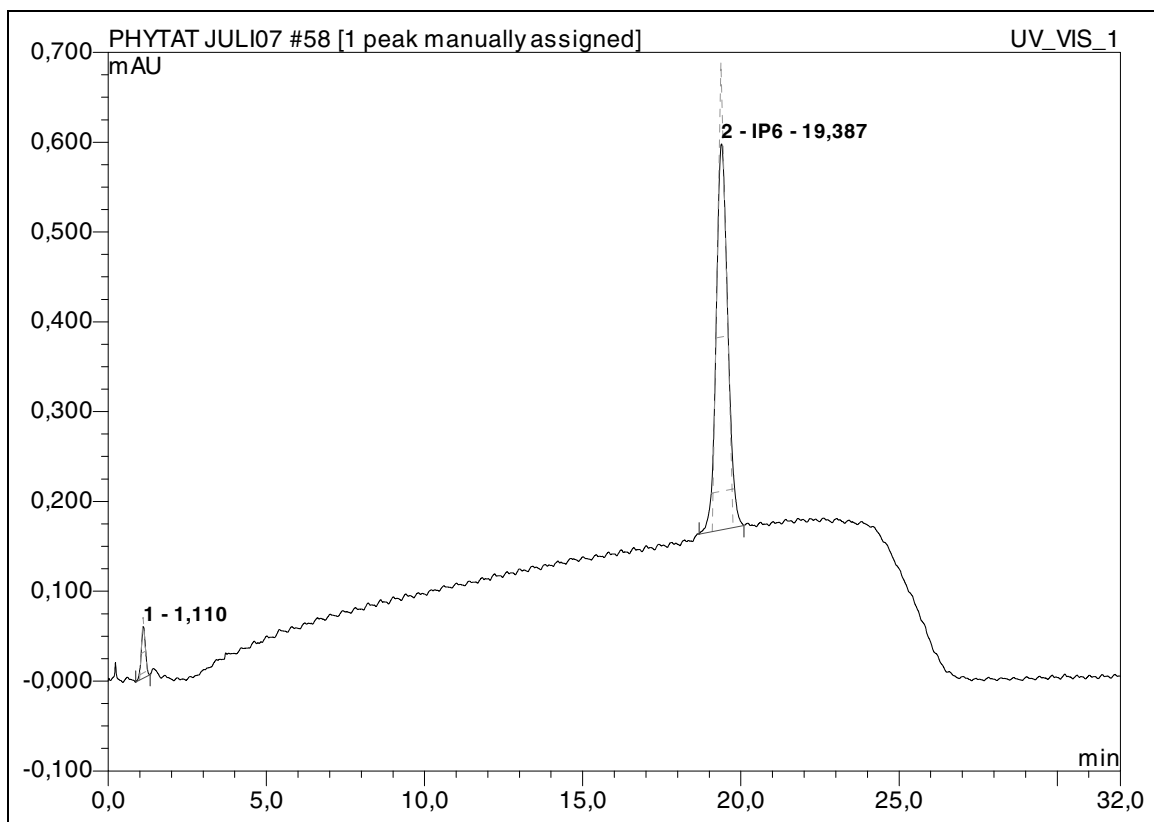


Abbildung 14: IP6 in den Nullproben

Tabelle 19: Peak-Analyse Inositolphosphate in den Nullproben

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,110	n.a.	0,058	0,249	n.a.	0,009	4,70
2	19,387	IP6	0,430	0,660	3,0604	0,182	95,30

n.a.: not available, d.h. der Wert ist nicht bestimmbar/verfügbar  
 Ret.Time min: Retentionszeit in min  
 Peakname: Peakbezeichnung  
 Height mAU: Peakhöhe  
 Width min: Peakbreite  
 Amount mmol/l: Menge in mmol/l  
 Area mAU\*min: Peakfläche  
 Rel.Area %: Relative Peakfläche in %

#### 4.6.3.1 *Aspergillus*-Phytase (Natuphos®)

Nach 15-minütiger Inkubation mit der pilzlichen Phytase Natuphos® lässt sich mit einem Anteil von 19,3% der gesamten Inositolphosphatmenge auf molarer Basis ein Abbauprodukt erkennen. Das 1,2,3,4,5-IP5 hat in diesem Chromatogramm eine Retentionszeit von 14,987 min (siehe Abbildung 15 und Tabelle 20) und hat einen Anteil von 0,5373 mmol/l. Es ist jedoch anzunehmen, dass es sich in diesem Fall eher um das 1,2,4,5,6-IP5 handelt, welches die Retentionszeit bei etwa 14,6 min aufweist (siehe Tabelle 21 und Abbildung 16, Natuphos® 45 min). Das Substrat IP6 ist noch mit 2,2471 mmol/l in der Probe enthalten. Die Summe der nachgewiesenen Inositolphosphate beträgt 2,7844 mmol/l.

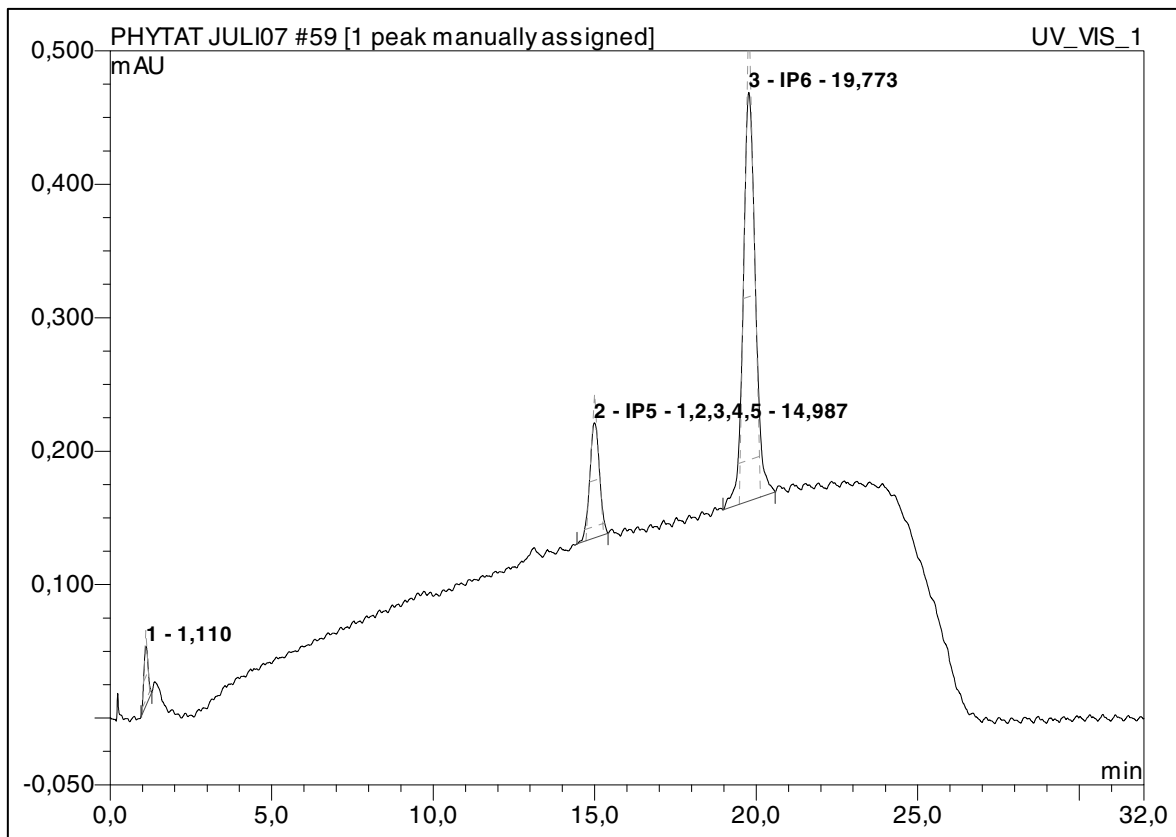


Abbildung 15: Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (15 min)

Tabelle 20: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (15 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,110	n.a.	0,045	0,247	n.a.	0,007	4,05
2	14,987	IP5 - 1,2,3,4,5	0,086	0,543	0,5373	0,031	17,85
3	19,773	IP6	0,306	0,656	2,2471	0,134	78,10

Das Hauptabbauprodukt nach 45 Minuten ist mit einem Anteil von 39,8% der Inositolphosphate das 1,2,4,5,6-IP5. Auch das 1,2,5,6-IP4 wird mit 0,3168 mmol/l und somit mit einem Anteil von 12,05% an der Gesamtmenge der Inositolphosphate detektiert. In geringen Mengen findet sich das 1,2,5-IP3 (siehe Abbildung 16 und Tabelle 21). Die Summe der nach 45-minütiger Inkubation detektierten Inositolphosphate beträgt 2,6277 mmol/l.

Tabelle 21: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (45 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,117	n.a.	0,034	0,253	n.a.	0,006	3,64
2	5,647	IP3 - 1,2,5	0,015	0,324	0,0858	0,003	2,06
3	8,773	IP4 - 2,3,4,5	0,007	0,359	0,0047	0,002	1,29
4	9,560	IP4 - 1,2,5,6	0,054	0,411	0,3168	0,014	9,02
5	12,787	IP5 - 1,2,3,4,5	0,013	0,283	0,0536	0,003	1,99
6	14,623	IP5 - 1,2,4,5,6	0,175	0,532	1,0462	0,059	38,51
7	19,333	IP6	0,161	0,613	1,1206	0,067	43,49

Nach 90-minütiger Inkubation ist nur noch wenig Substrat (IP6) vorhanden. Die Hauptabbauprodukte sind das 1,2,4,5,6-IP5, das 1,2,5,6-IP4 sowie das 1,2,5-IP3 (Abbildung 17 und Tabelle 22). Die jeweiligen Anteile liegen bei 0,9448 mmol/l, 0,5801 mmol/l und 0,6140 mmol/l. Mehr als ein Drittel (38,5%) der Abbauprodukte sind IP5. Die Gesamtmenge der Inositolphosphate beträgt 2,5410 mmol/l.

Tabelle 22: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (90 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,353	n.a.	0,028	0,314	n.a.	0,005	3,94
2	5,577	IP3 - 1,2,5	0,067	0,490	0,6140	0,023	16,54
3	8,680	IP4 - 2,3,4,5	0,022	0,471	0,0164	0,007	5,11
4	9,510	IP4 - 1,2,5,6	0,096	0,417	0,5801	0,025	18,56
5	12,683	IP5 - 1,2,3,4,5	0,008	1,926	0,0318	0,002	1,33
6	14,550	IP5 - 1,2,4,5,6	0,156	0,541	0,9448	0,053	39,09
7	19,293	IP6	0,052	0,738	0,3539	0,021	15,44

# ERGEBNISSE

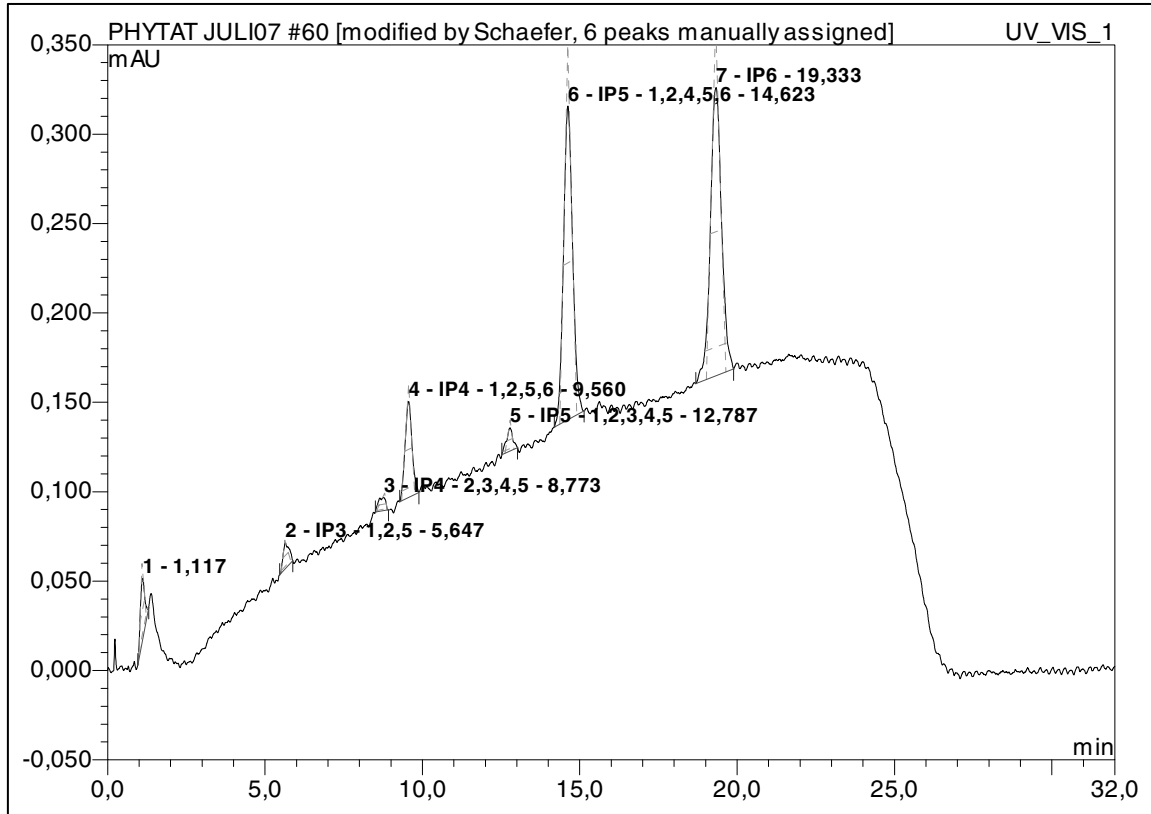


Abbildung 16: Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (45 min)

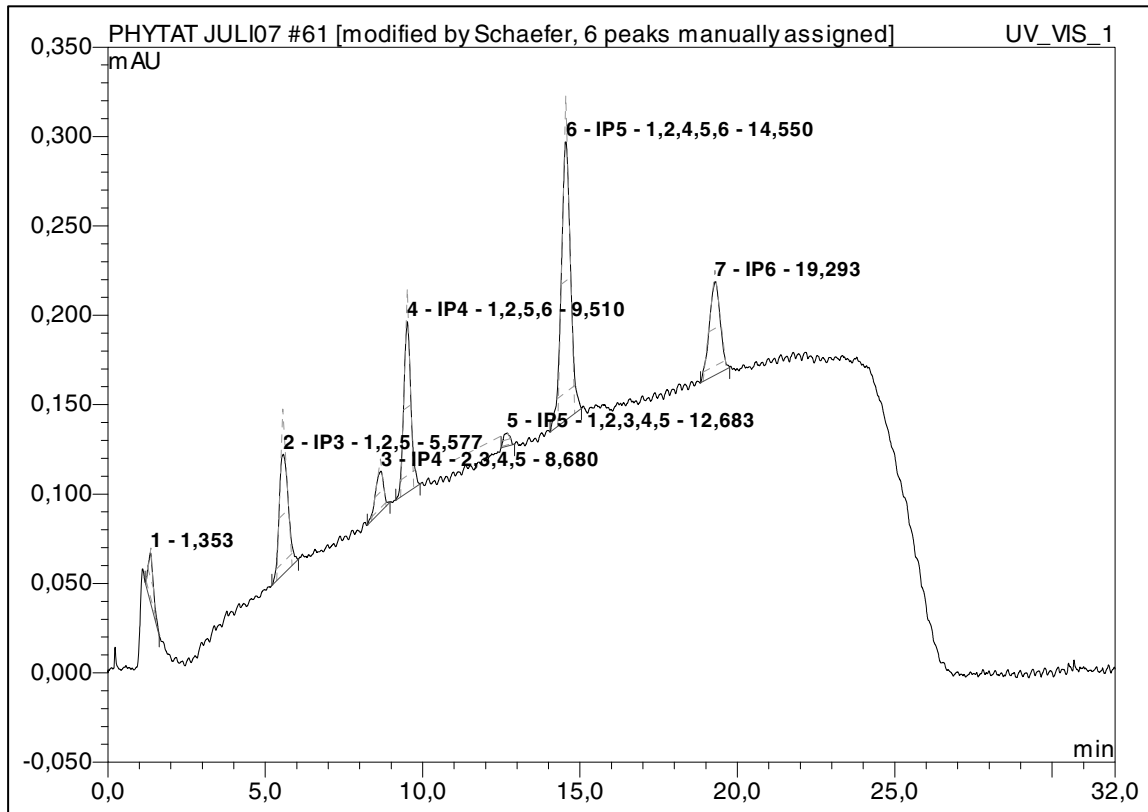


Abbildung 17: Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (90 min)

## E R G E B N I S S E

Die nach 90 Minuten vorherrschenden Abbauprodukte sind im Wesentlichen auch nach zweistündiger Inkubation auf dem Chromatogramm zu erkennen (Abbildung 18). Es hat sich jedoch die Verteilung etwas verändert, wie in Tabelle 23 dargestellt. Das Hauptabbauprodukt der pilzlichen Phytase nach 120 min ist mit einem Anteil von fast 43% (0,9424 mmol/l) das 1,2,5-IP3. IP5 ist in der Probe zu etwa 26% enthalten. Ein fast ebenso großer Anteil der Inositolphosphate liegt als IP4 vor, aber auch ein Rest von ca. 4,5% (0,0955mmol/l) des Substrates ist zu finden. Es zeigt sich, dass die *Aspergillus*-Phytase nicht in der Lage ist, in 120 Minuten das Substrat komplett abzubauen. Die Summe der insgesamt gefundenen Inositolphosphate weicht nach 120-minütiger Inkubation etwas von der zuvor relativ konstant detektierten Menge ab. Es sind insgesamt nur 2,1953 mmol/l in der Probe vorhanden. Somit weicht die Summe der Inositolphosphate in dieser 120-Minuten-Probe geringfügig nach unten ab. In den 15-, 45- und 90-Minuten-Proben lag die durchschnittliche Summe bei 2,65 mmol/l und ist nahezu konstant geblieben.

Tabelle 23: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (120 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,327	n.a.	0,031	0,334	n.a.	0,007	5,94
2	5,510	IP3 - 1,2,5	0,108	0,488	0,9424	0,035	30,44
3	8,613	IP4 - 2,3,4,5	0,024	0,939	0,0221	0,009	8,24
4	9,453	IP4 - 1,2,5,6	0,085	0,412	0,5294	0,023	20,31
5	12,703	IP5 - 1,2,3,4,5	0,009	0,264	0,0358	0,002	1,79
6	14,687	IP5 - 1,2,4,5,6	0,097	0,520	0,5701	0,032	28,28
7	19,613	IP6	0,018	0,704	0,0955	0,006	4,99

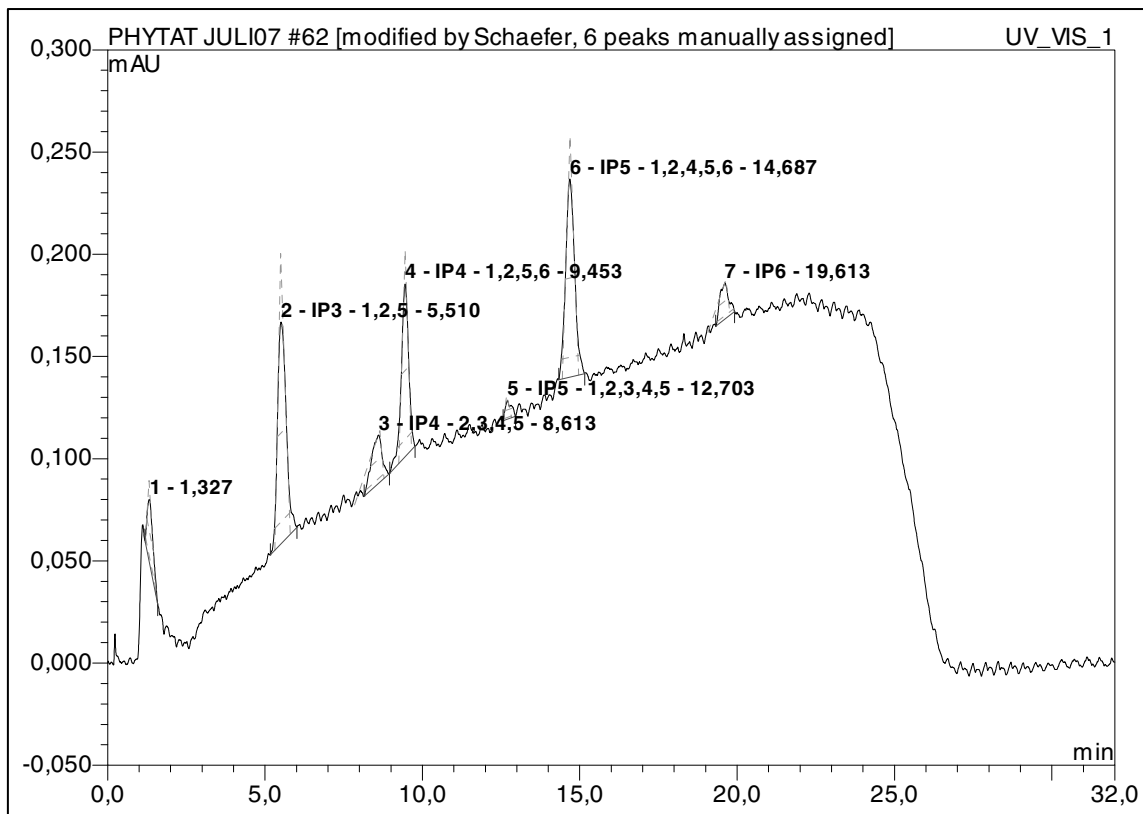


Abbildung 18: Inositolphosphate nach Inkubation mit Natuphos® (120 min)



Abbildung 19 zeigt das prozentuale molare Verhältnis der beim Substratabbau durch die *Aspergillus*-Phytase entstehenden Abbauprodukte. Es ist erkennbar, dass IP6 sukzessive verschwindet. Parallel entstehen die Abbauprodukte IP5 nach 15 Minuten und IP4 etwas zeitverzögert. Das Abbauprodukt IP3 entsteht erst spät, etwa nach 45 Minuten. Nach 90-minütiger Inkubation ist prozentual gesehen noch am meisten IP5 in der Probe enthalten, nach 120 Minuten überwiegt das IP3 mit etwa 40%.

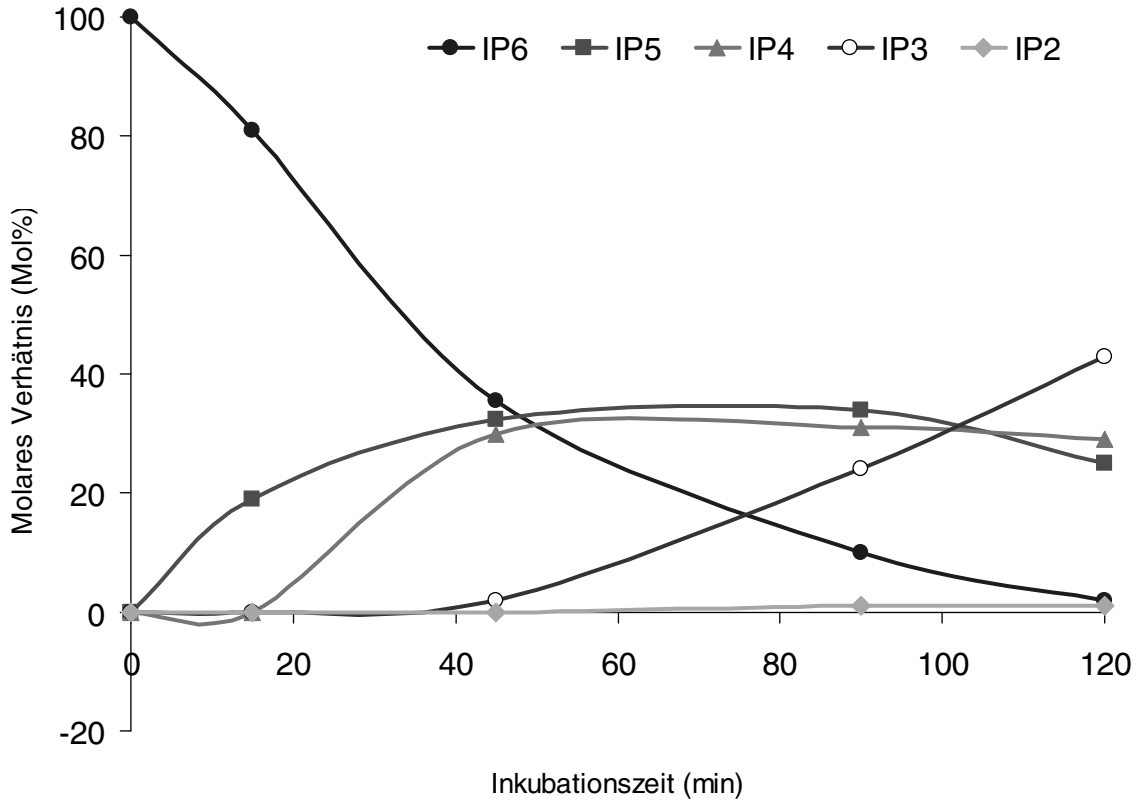


Abbildung 19: Molares Verhältnis (Mol%) der Inositolphosphate während der Inkubation mit einer *Aspergillus*-Phytase

#### 4.6.3.2 *E.coli*-Phytase (Optiphos)

Nach 15-minütiger Inkubation mit Optiphos sind 0,5048 mmol/l 1,2,3,4,5-IP5 und 0,1015 mmol/l 2,3,4,5-IP4 im Chromatogramm detektierbar (Abbildung 19 und Tabelle 24). Vom Substrat IP6 sind noch 1,6025 mmol/l in der Probe enthalten. Somit beträgt die Gesamtmenge der Inositolphosphate 2,2088 mmol/l.

Tabelle 24: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (15 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,110	n.a.	0,061	0,303	n.a.	0,011	6,87
2	1,343	n.a.	0,043	0,480	n.a.	0,011	7,33
3	9,927	IP4 - 2,3,4,5	0,019	0,367	0,1015	0,004	2,84
4	13,233	IP5 - 1,2,3,4,5	0,095	0,480	0,5048	0,029	18,27
5	19,997	IP6	0,245	0,655	1,6025	0,102	64,71

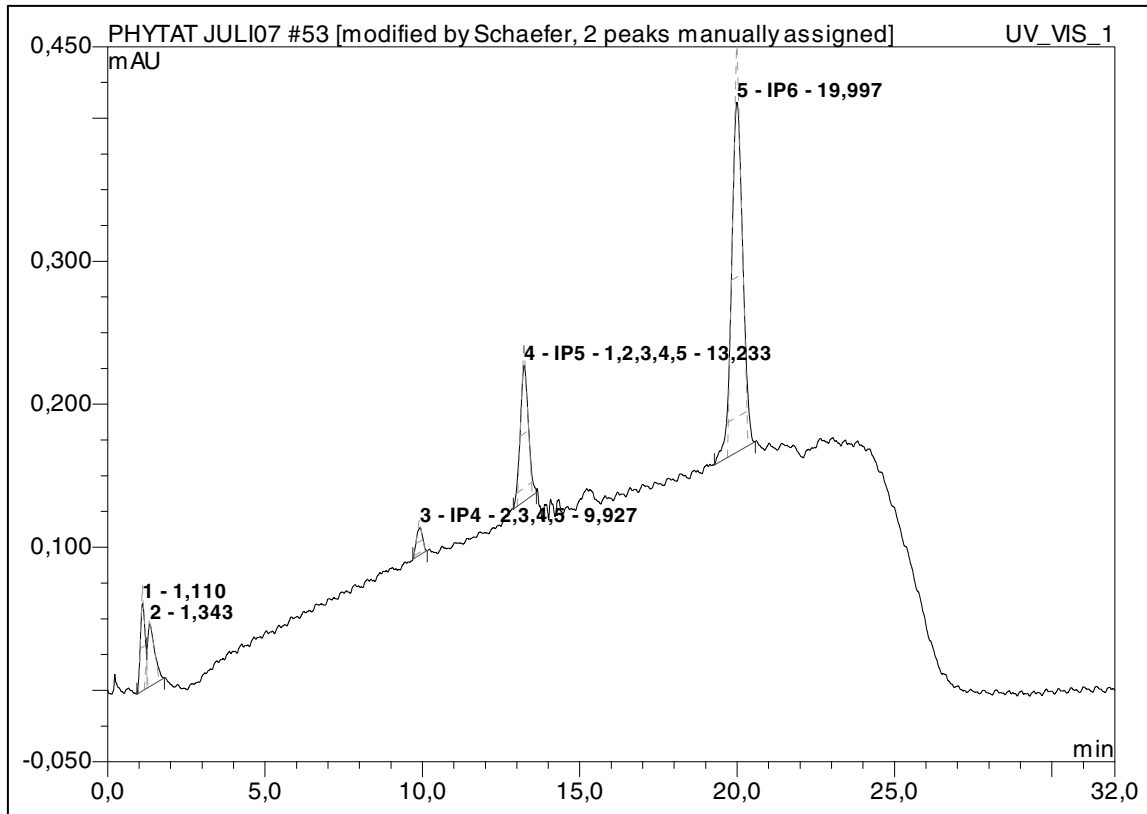


Abbildung 20: Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (15 min)

Genau wie bei der *Aspergillus*-Phytase hat auch die Inkubation mit der Phytase aus *E.coli* nach einer Dreiviertelstunde zu fünf Abbauprodukten geführt. Im Chromatogramm sind demnach neben dem Substrat fünf weitere Peaks erkennbar. Bei Natuphos® sind nach dieser Inkubationszeit die Hauptanteile in der Probe das IP6 und das IP5. Bei der Optiphos-Probe ist mit einem Anteil von fast 60% (1,7512 mmol/l) 2,3,4,5-IP4 das Hauptabbauprodukt, gefolgt von 1,2,3,4,5.-IP5 (0,4886 mmol/l) und 0,2228 mmol/l des IP6 (ca. 7% der gesamten Inositolphosphate). Auch ein IP3 ist bereits mit 0,2753 mmol/l (ca. 9% der gesamten Inositolphosphate) in der Probe detektiert worden. Der Abbau des Substrates durch die *E.coli*-Phytase ist viel effizienter, als der Abbau durch die *Aspergillus*-Phytase.

Die Summe der Inositolphosphate in dieser Probe beträgt 2,966 mmol/l. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 und Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (45 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	5,877	IP3 -2,4,5	0,017	1,142	0,2753	0,007	5,34
2	8,823	IP4 - 1,2,4,5	0,018	0,536	0,1914	0,004	2,86
3	9,857	IP4 - 2,3,4,5	0,254	0,435	1,7512	0,077	58,38
4	13,223	IP5 - 1,2,3,4,5	0,089	0,476	0,4886	0,028	21,08
5	15,170	IP5 - 1,2,4,5,6	0,009	0,609	0,0367	0,002	1,61
6	19,993	IP6	0,035	0,713	0,2228	0,014	10,73

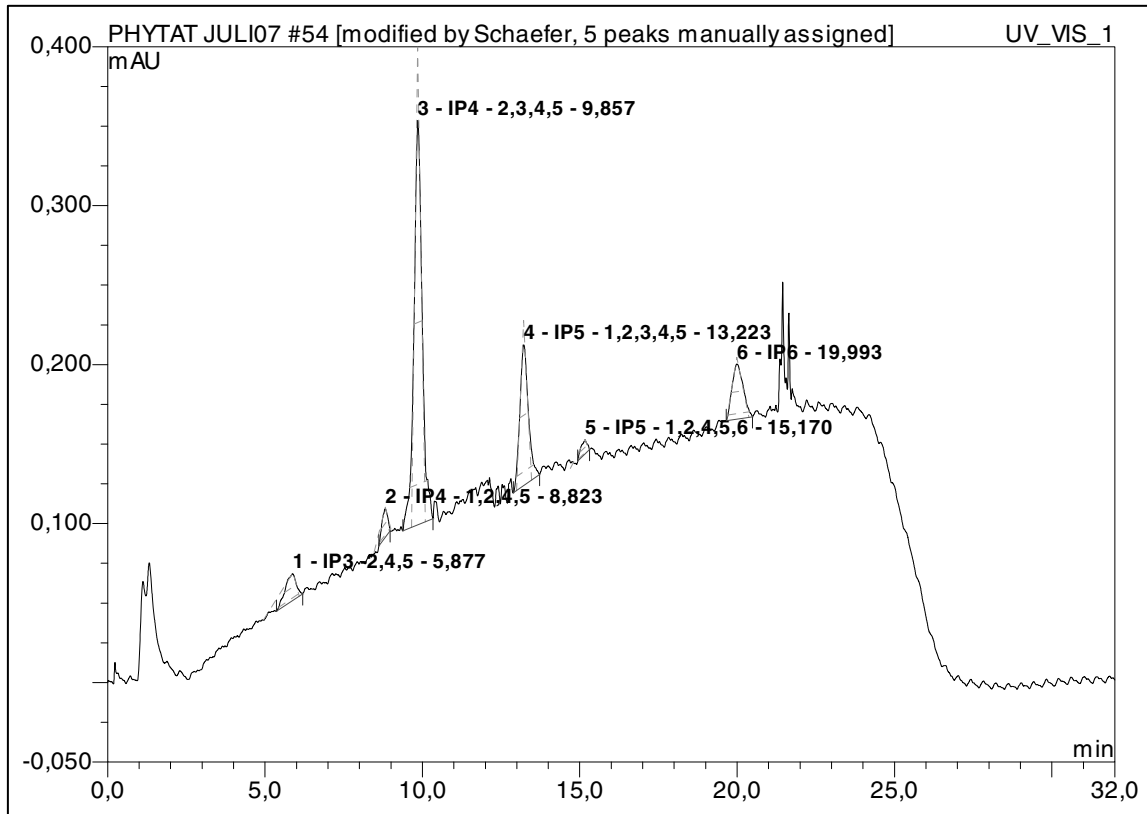


Abbildung 21: Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (45 min)

In Abbildung 22 sind zwei Peaks erkennbar, 2,3,4,5-IP4 sowie 2,4,5-IP3. Nach 90-minütiger Inkubation hat die *E.coli*-Phytase das Substrat komplett abgebaut, bis zu den Abbauprodukten IP4 (1,6771 mmol/l) und IP3 (1,0525 mmol/l). Diese Ergebnisse sind Tabelle 26 zu entnehmen. Die Summe der Inositolphosphate beträgt in dieser Probe 2,7296 mmol/l.

Tabelle 26: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (90 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	5,747	IP3 -2,4,5	0,068	0,577	1,0525	0,027	26,76
2	9,790	IP4 - 2,3,4,5	0,251	0,454	1,6771	0,074	73,24

Der Abbauvorgang ist nach 120 Minuten noch weiter fortgeschritten. Die *E.coli*-Phytase hat in 120 min das Substrat komplett abgebaut und als Abbauprodukte sind nur noch IP4 und IP3 in der Probe vorhanden. In Abbildung 23 ist erkennbar, dass sich die Gewichtung der Abbauprodukte verschoben hat (Tabelle 27). In Zahlen ausgedrückt sind nach zwei Stunden Inkubation mit der bakteriellen Phytase 64,3% (1,7946 mmol/l) IP4 und 45,7% (1,5126 mmol/l) IP3 vorhanden. Des Weiteren findet sich ein deutlicher Anteil der bereits in Abschnitt 4.6.3 erwähnten, nicht genauer definierten Substanz. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es sich um ein Abbauprodukt wie z.B. ein IP2, IP1 oder um freies Phosphat handelt.

Die Gesamtsumme der detektierten Inositolphosphate beträgt 3,3072 mmol/l. Die Summe der Inositolphosphate war bei den 45-, 90- und 120-Minuten-Proben relativ konstant mit

## E R G E B N I S S E

einem Mittelwert von 3,0 mmol/l. Abweichend davon stellt sich jedoch mit 2,2088 mmol/l die Summe der Inositolphosphate in der 15-Minuten-Probe dar.

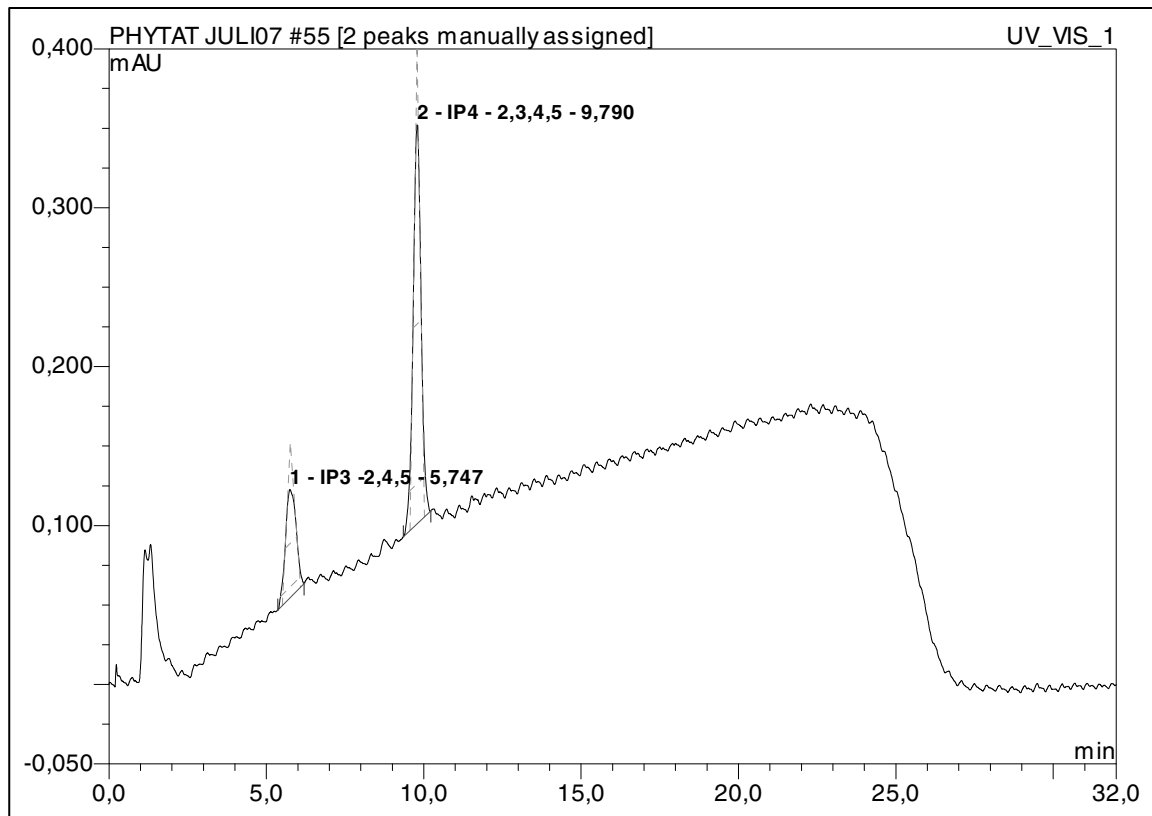


Abbildung 22: Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (90 min)

Tabelle 27: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (120 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,320	n.a.	0,104	0,456	n.a.	0,037	23,36
2	5,760	IP3 -2,4,5	0,108	0,554	1,5126	0,039	24,07
3	9,773	IP4 - 2,3,4,5	0,280	0,428	1,7946	0,079	49,05

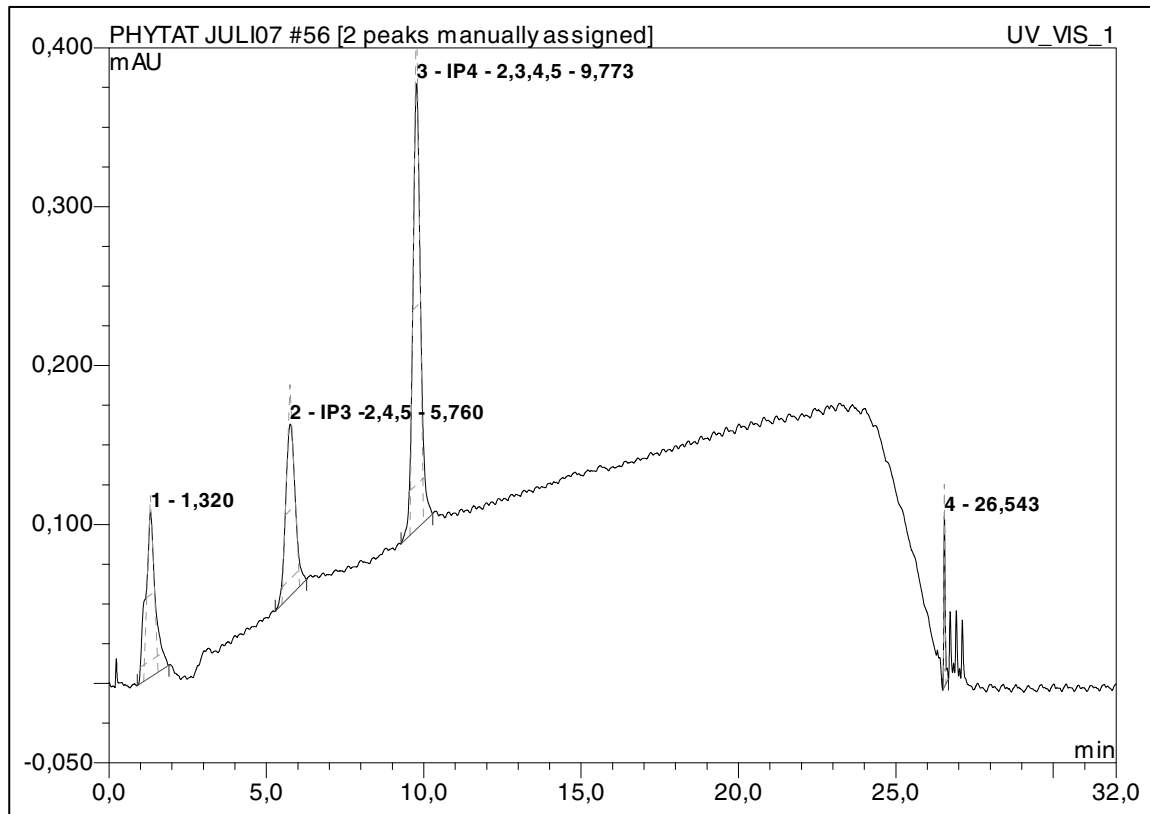


Abbildung 23: Inositolphosphate nach Inkubation mit Optiphos (120 min)

Abbildung 24 zeigt das prozentuale molare Verhältnis der beim Substratabbau durch die *E.coli*-Phytase entstehenden Abbauprodukte. Es ist erkennbar, dass IP6 schnell abgebaut ist. Bereits nach 45 Minuten sind nur noch etwa 5% der Inositolphosphate IP6, während bereits ca. 65% IP4 vorhanden sind. Der IP4-Anteil nimmt im Zeitverlauf schnell zu, jedoch ist nach 90 Minuten Inkubation bereits der Anteil des IP3 mit etwa 55% am größten.

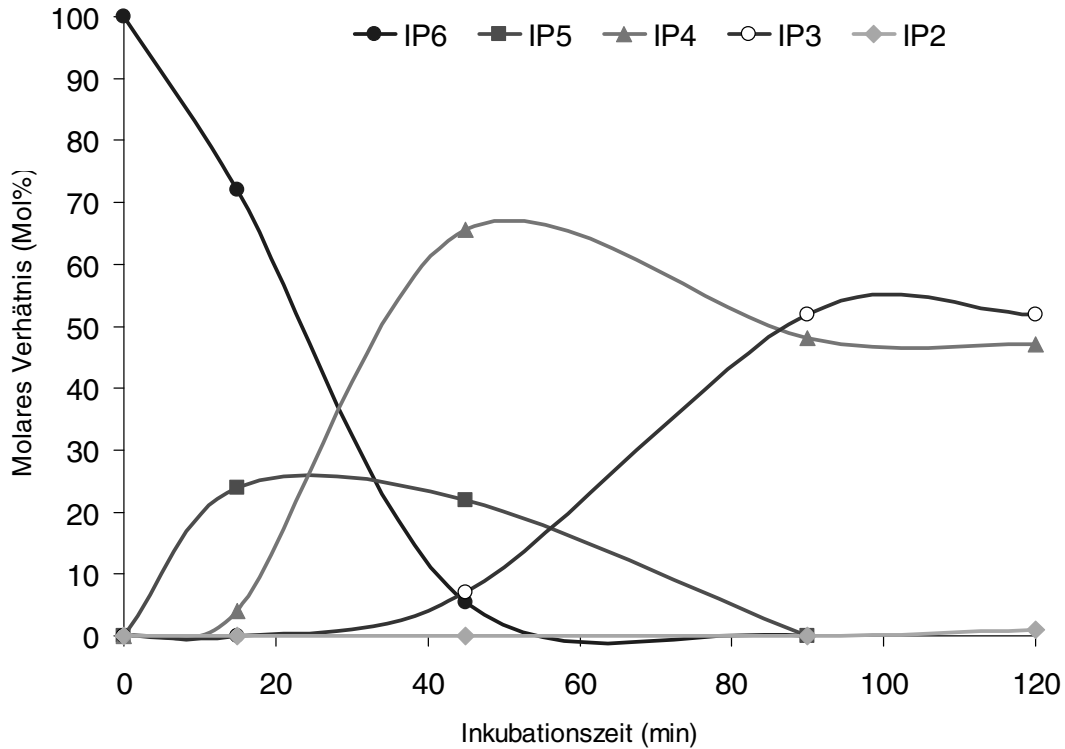


Abbildung 24: Molares Verhältnis (Mol%) der Inositolphosphate während der Inkubation mit einer *E.coli*-Phytase

#### 4.6.3.3 *Bacillus amyloliquefaciens*-Phytase

In Abbildung 25 sind zwei Peaks erkennbar, IP6 sowie 1,2,4,5,6-IP5. Nach 15-minütiger Inkubation mit der Phytase aus *Bacillus amyloliquefaciens* sind 13,2% (0,2460 mmol/l) IP5 und 86,8% (1,6063 mmol/l) IP6 in der Probe detektierbar. Insgesamt konnten demnach 1,8523 mmol/l an Inositolphosphaten gefunden werden. Diese Ergebnisse sind Tabelle 28 zu entnehmen.

Tabelle 28: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit *Bacillus amyloliquefaciens* (15 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,130	n.a.	0,171	0,256	n.a.	0,030	20,29
2	17,770	IP5 - 1,2,4,5,6	0,059	0,357	0,2460	0,014	9,75
3	22,740	IP6	0,247	0,885	1,6063	0,102	69,96

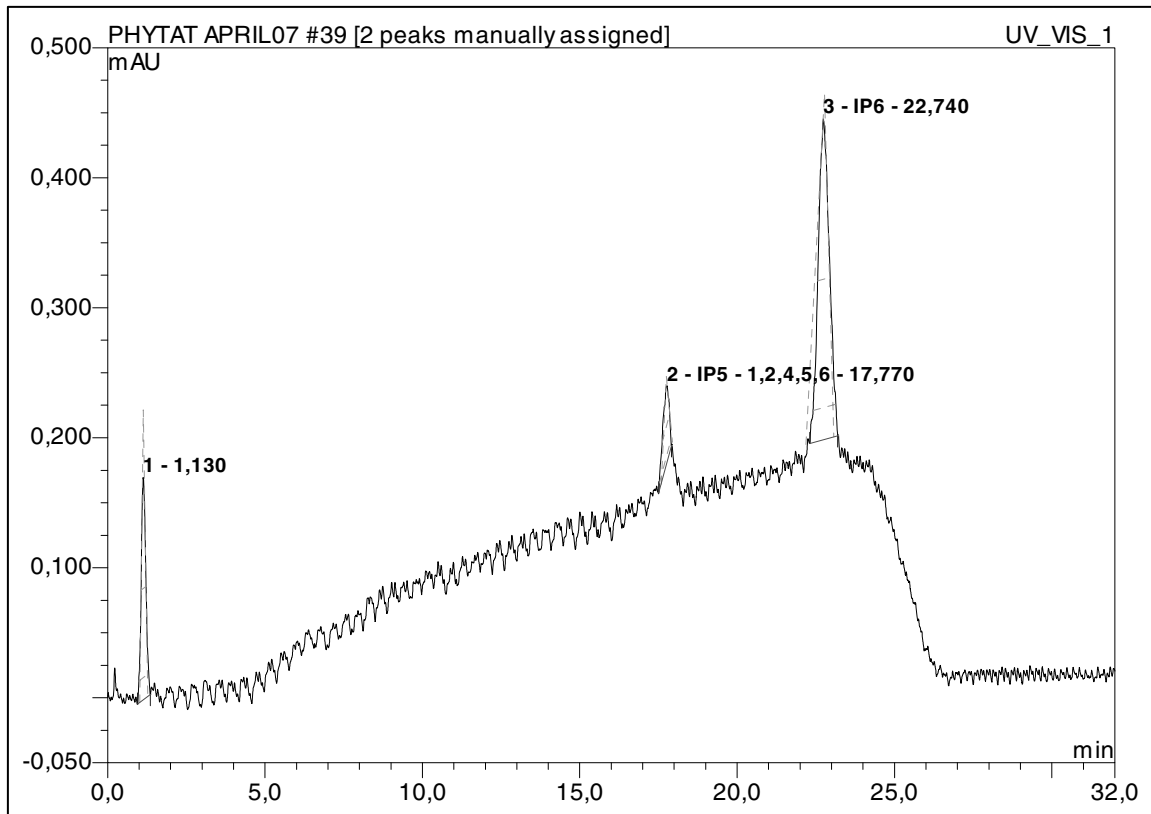


Abbildung 25: Inositolphosphate nach Inkubation mit *Bacillus amyloliquefaciens* (15 min)

Nach 45 Minuten findet man in der Probe 51% (0,9383 mmol/l) IP6, 48,8% (0,8975 mmol/l) 1,2,4,5,6-IP5 sowie einen kleinen Anteil (0,2%) 2,4,5,6-IP4. Die Summe der Inositolphosphate beträgt 1,8398 mmol/l. Das Chromatogramm ist in Abbildung 26 dargestellt, die entsprechenden Ergebnisse in Tabelle 29.

Tabelle 29: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit *Bacillus amyloliquefaciens* (45 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,143	n.a.	0,189	0,260	n.a.	0,033	22,93
2	11,863	IP4 - 2,4,5,6	0,012	0,099	0,0040	0,001	0,54
3	16,773	IP5 - 1,2,4,5,6	0,169	0,765	0,8975	0,052	35,61
4	21,873	IP6	0,165	0,956	0,9383	0,059	40,92

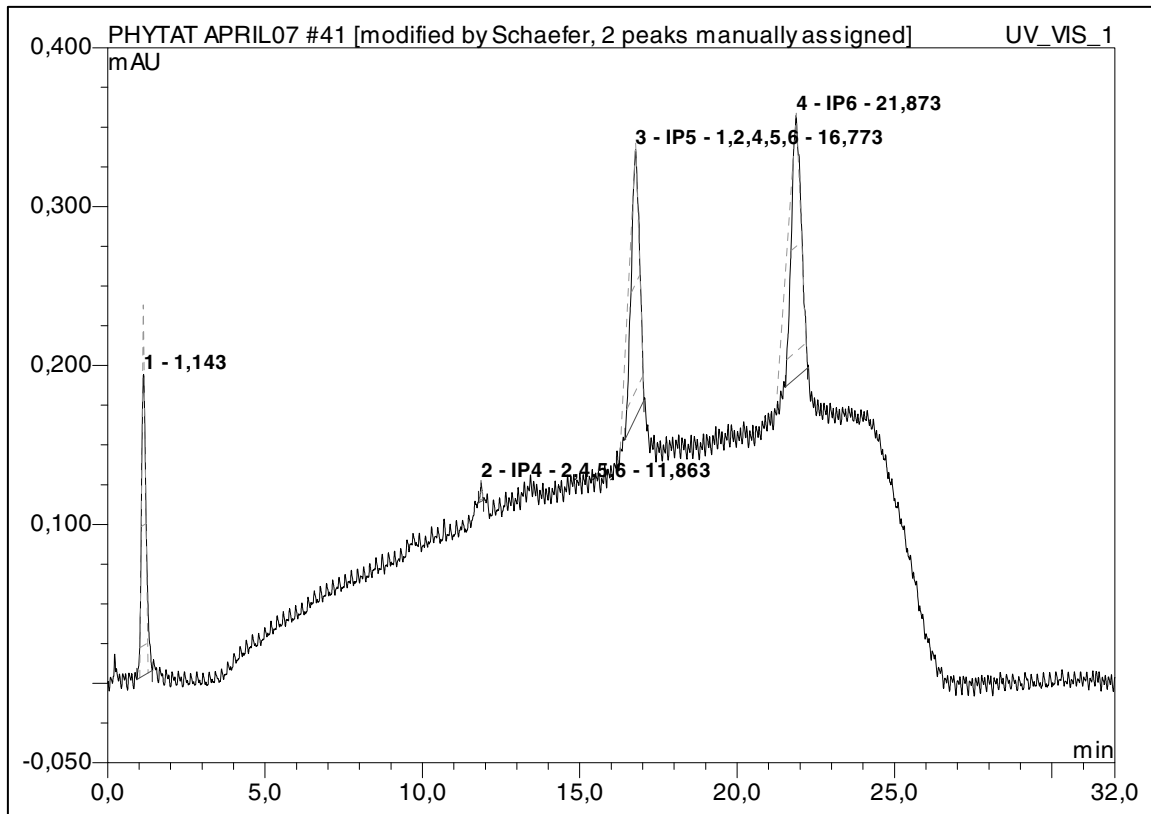


Abbildung 26: Inositolphosphate nach Inkubation mit *Bacillus amyloliquefaciens* (45 min)

Nach 90-minütiger Inkubation mit der *Bacillus amyloliquefaciens*-Phytase sind im Chromatogramm vier Peaks erkennbar (Abbildung 27). Zusätzlich zu den bereits nach 45 Minuten gefundenen Abbauprodukten ist ein weiteres erkennbar, welches jedoch nicht identifiziert werden konnte (Retentionszeit: 9,7 min).

Nach 90 Minuten sind 18,4% (0,2524 mmol/l) IP6, 78,5% (1,0800 mmol/l) 1,2,4,5,6-IP5, 3,1% (0,0422 mmol/l) 2,4,5,6-IP4 sowie ein Anteil des nicht identifizierten Inositolphosphates in der Probe detektierbar. Die Summe der nachgewiesenen Inositolphosphate beträgt 1,3747 mmol/l, allerdings ohne Berücksichtigung des Abbauproduktes mit der Retentionszeit von 9,7 min). Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 zu finden.

Tabelle 30: Tabelle: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit *Bacillus amyloliquefaciens* (90 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,150	n.a.	0,198	0,268	n.a.	0,036	28,68
2	9,707	n.a.	0,014	0,123	n.a.	0,002	1,81
3	11,670	IP4 - 2,4,5,6	0,039	0,285	0,0422	0,008	6,61
4	16,487	IP5 - 1,2,4,5,6	0,193	0,513	1,0800	0,062	50,04
5	21,433	IP6	0,055	0,383	0,2524	0,016	12,86



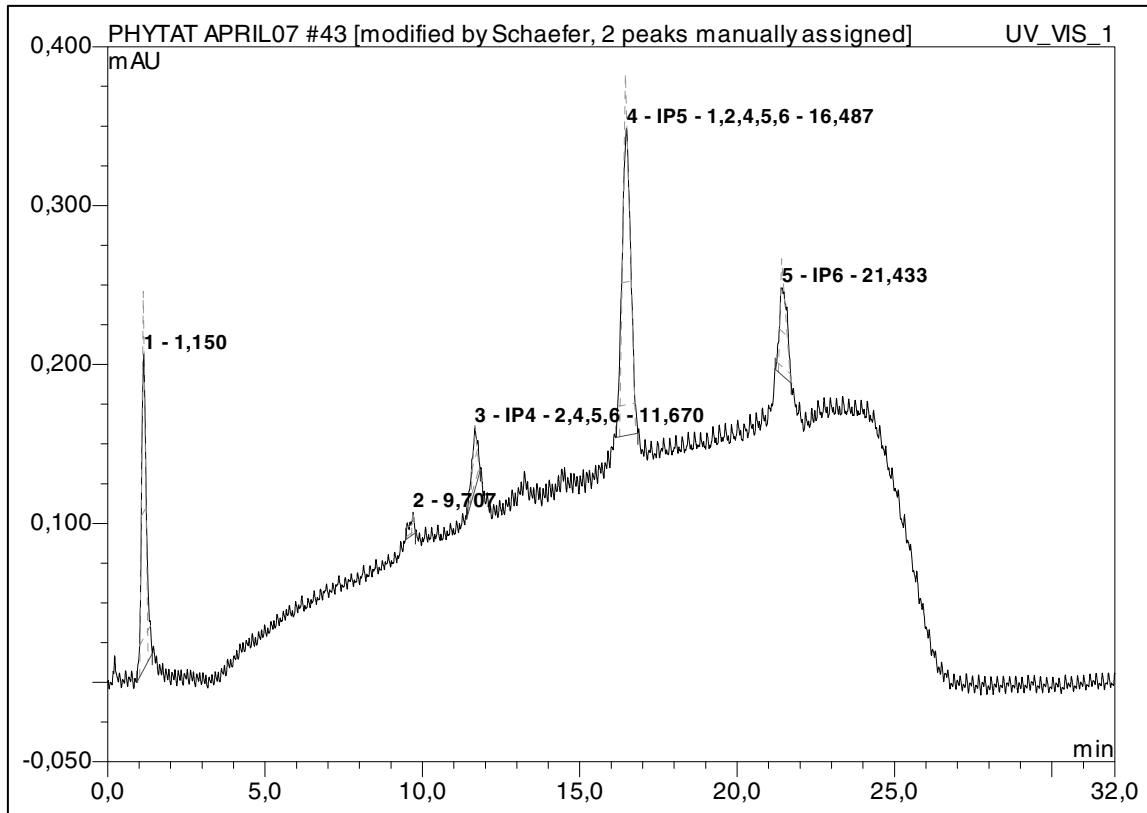


Abbildung 27: Inositolphosphate nach Inkubation mit *Bacillus amyloliquefaciens* (90 min)

Nach zwei Stunden ist der Abbauvorgang des Substrates zwar weiter fortgeschritten, jedoch ist die *Bacillus*-Phytase das am langsamsten abbauende Enzym der drei in dieser Arbeit verglichenen Enzyme: In Abbildung 28 sowie der zugehörigen Tabelle 31 ist erkennbar, dass 7,1% (0,0569 mmol/l) IP6, 83,3% (0,6636 mmol/l) 1,2,4,5,6-IP5, 9,6% (0,0764 mmol/l) 2,4,5,6-IP4 sowie ein etwas größer gewordener Anteil des nicht identifizierten Inositolphosphates in der Probe aufzufinden sind. Die Inositolphosphat-Summe beträgt in dieser Probe nur 0,7969 mmol/l. Somit ist zu erkennen, dass die Summe der detektierten Abbauprodukte auf molarer Basis in den ersten beiden Proben (15 Minuten und 45 Minuten) mit einem Wert von durchschnittlich 1,85 mmol/l konstant war, die Summe der Inositolphosphate ab der 90-Minuten-Probe jedoch deutlich abnimmt. Dies lässt sich bei dieser *Bacillus*-Probereihe dadurch erklären, dass bei der 90- und 120 Minuten-Probe ein Inositolphosphat gefunden wurde (Retentionszeit: 9,7 min), welches jedoch nicht bestimmt werden konnte. Somit konnte auch der molare Anteil an der Gesamtsumme der Abbauprodukte nicht dargestellt werden. Die Anteile an diesem unbekanntem Abbauprodukt müßten demnach theoretisch zur Summe der Inositolphosphate hinzugerechnet werden.

Tabelle 31: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit *Bacillus amyloliquefaciens* (120 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,140	n.a.	0,182	0,288	n.a.	0,032	34,70
2	9,700	n.a.	0,018	0,118	n.a.	0,004	4,41
3	11,670	IP4 - 2,4,5,6	0,063	0,322	0,0764	0,015	15,98
4	16,397	IP5 - 1,2,4,5,6	0,127	0,916	0,6636	0,038	41,04
5	21,320	IP6	0,023	0,140	0,0569	0,004	3,87

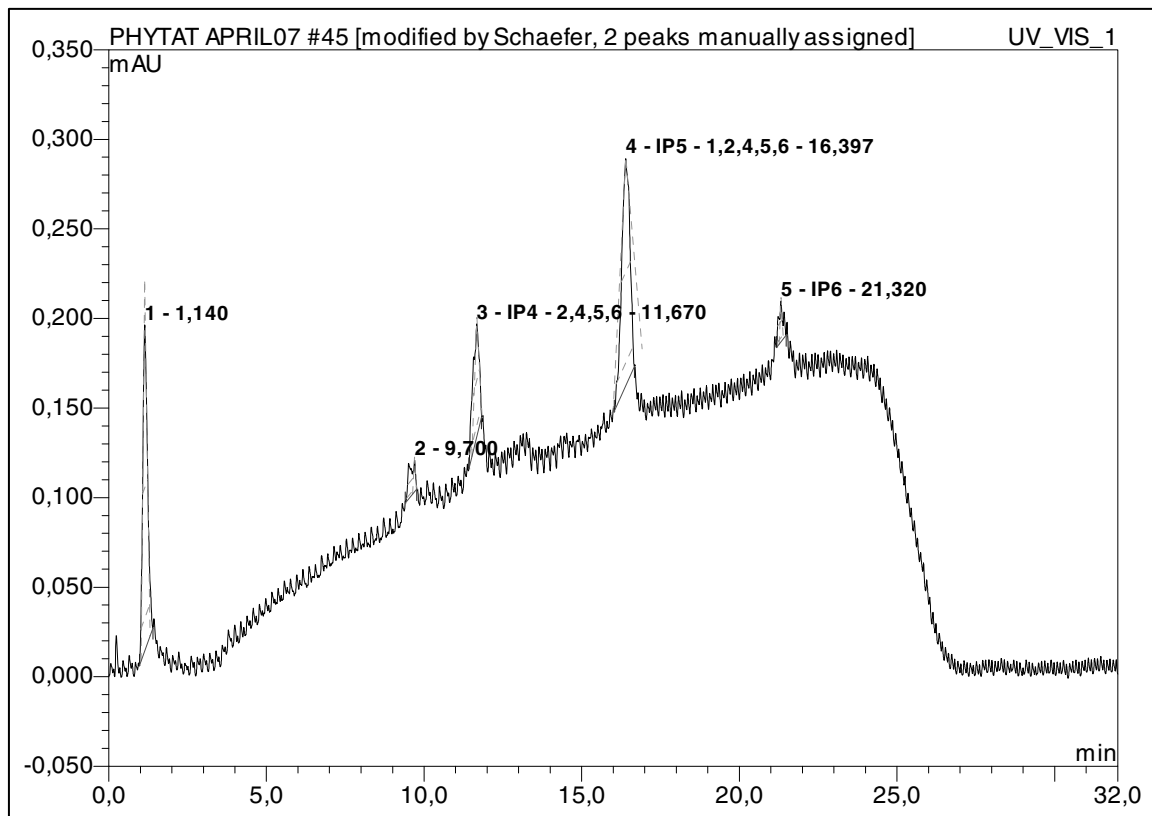


Abbildung 28: Inositolphosphate nach Inkubation mit *Bacillus amyloliquefaciens* (120 min)

#### 4.6.4 Produkte aus dem sequentiellen Phytatabbau durch eine *E.coli*- und eine *Bacillus*-Phytase

Bei den beiden Phytasen, die in diesem Versuch kombiniert wurden, handelt es sich um Enzyme mit unterschiedlichem Hauptwirkungsort: Die *E.coli*-Phytase hat ein pH-Optimum im sauren Bereich, so dass diese Phytase hauptsächlich im Magen wirksam sein kann. Die *Bacillus*-Phytase hingegen weist ein pH-Optimum im neutralen Bereich auf und kann somit am besten im Dünndarm wirken. Es sollte in dieser Versuchsreihe überprüft werden, ob durch kombinierten Einsatz der *E.coli*- und *Bacillus*-Phytase Verbesserungen im Phytatabbau gezeigt werden können und ob die *Bacillus*-Phytase als Ausgangsprodukte bzw. Substrate die Abbauprodukte der zuerst eingesetzten *E.coli*-Phytase nutzen kann.

Auch bei dieser Versuchsreihe wurde zunächst die Nullprobe mittels HPLC untersucht. Es zeigte sich das gleiche Ergebnis wie in Abbildung 14 in Abschnitt 4.6.3 dargestellt.

##### 4.6.4.1 Sequentieller Phytatabbau

In der Probe, die ausschließlich 60 Minuten lang mit der Optiphos-Phytase inkubiert wurde, wurden die in Abbildung 29 sichtbaren Inositolphosphate detektiert.

Die insgesamt 5 Abbauprodukte und das Substrat wurden, wie in Tabelle 32 ersichtlich, in den folgenden Mengen nachgewiesen: 9,8% (0,3309mmol/l) IP6, 1,2% (0,0421 mmol/l) 1,2,4,5,6-IP5, 15,8% (0,5341 mmol/l) 1,2,3,4,5-IP5, 44,9% (1,5184 mmol/l) 2,3,4,5-IP4, 12,4% (0,4180mmol/l) 1,2,4,5-IP4 und 15,8% (0,5347 mmol/l) 2,4,5-IP3. Den Hauptanteil in der Probe macht somit das 2,3,4,5-IP4 aus. Die Gesamtsumme der Inositolphosphate in der Probe mit den Abbauprodukten der *E.coli*-Phytase beträgt 3,3782 mmol/l.

Tabelle 32: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit der *E.coli*-Phytase (60 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,173	n.a.	0,063	0,533	n.a.	0,024	15,00
2	5,757	IP3 - 2,4,5	0,035	0,524	0,5347	0,013	8,16
3	8,937	IP4 - 1,2,4,5	0,024	0,491	0,4180	0,008	4,91
4	10,003	IP4 - 2,3,4,5	0,204	0,473	1,5184	0,063	39,81
5	13,410	IP5 - 1,2,3,4,5	0,085	0,505	0,5341	0,029	18,13
6	15,430	IP5 - 1,2,4,5,6	0,007	0,448	0,0421	0,002	1,45
7	20,327	IP6	0,044	0,663	0,3309	0,020	12,53

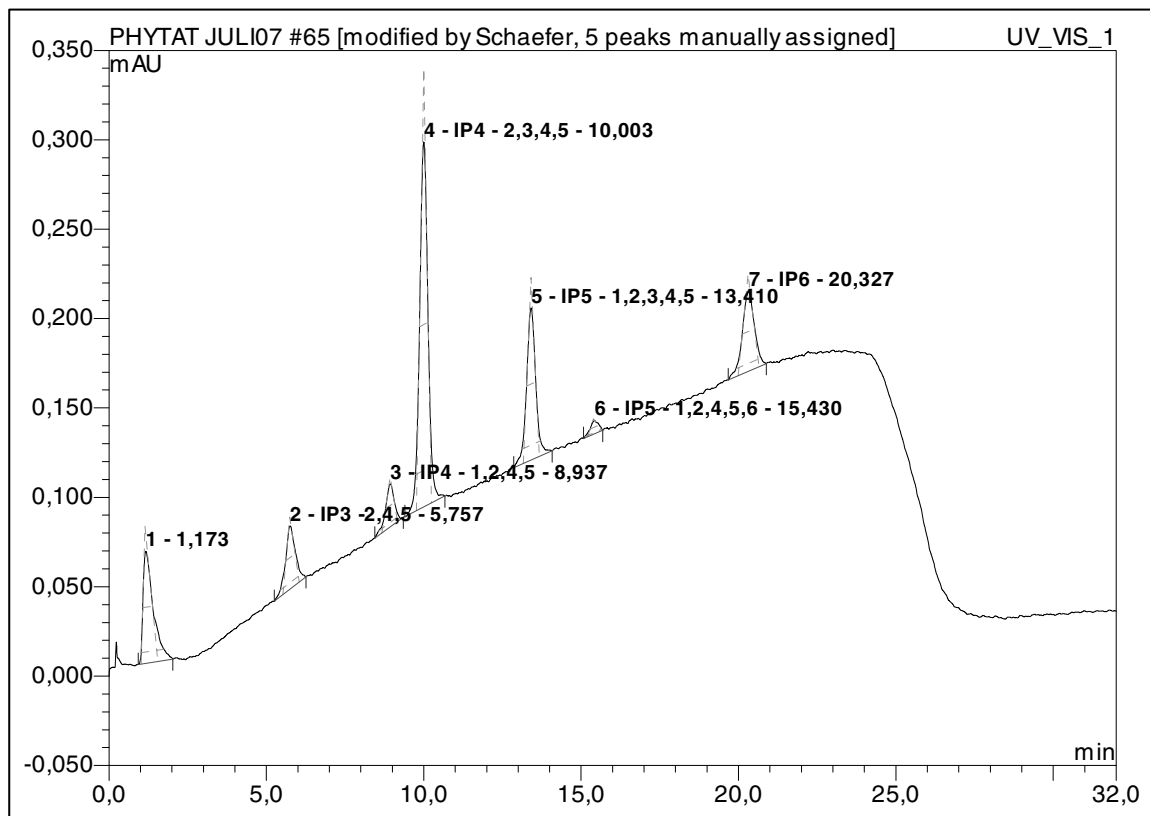


Abbildung 29: Inositolphosphate nach Inkubation mit der *E.coli*-Phytase (60 min)

Die beiden anderen Proben, die ebenfalls eine Stunde mit dem *E.coli*-Enzym inkubiert wurden, wurden anschließend noch mit der *Bacillus*-Phytase inkubiert. Die Substrate waren in diesen Fällen die Abbauprodukte aus der 60-minütigen Inkubation mit Optiphos (siehe Abbildung 29 und Tabelle 32).

Die eine der beiden Proben wurde dem Wasserbad nach 45 Minuten entnommen, die zweite Probe nach 90 Minuten.

Bei der 45-Minuten-Probe sind die folgenden Abbauprodukte im Chromatogramm sichtbar (Abbildung 30):

1,2,4,5,6-IP5 (0,1241 mmol/l), 1,2,3,4,5-IP5 (0,3696 mmol/l), 1,2,5,6-IP4 (Menge konnte nicht detektiert werden), 2,3,4,5-IP4 (0,8943 mmol/l), 1,2,4,5-IP4 (0,2934 mmol/l), 2,4,5,6-IP4 (0,0019 mmol/l), 2,4,5-IP3 (0,8615 mmol/l) sowie ein nicht analysierter Anteil des bereits in Abschnitt 4.6.3 beschriebenen Abbauproduktes, welches nicht analysiert werden konnte. Den größten Teil macht bei dieser Probe mit einem prozentualen Anteil von 35,1% an der

gesamten Inositolphosphatmenge das 2,3,4,5-IP4 aus, dicht gefolgt von dem 2,4,5-IP3 (33,9%). Die Gesamtmenge der Inositolphosphate auf molarer Basis beträgt 2,5448 mmol/l. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 aufgezeigt.

Tabelle 33: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit der *E.coli*-Phytase (60 min) und der *Bacillus*-Phytase (45 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,157	n.a.	0,088	0,510	n.a.	0,035	26,83
2	5,800	IP3 -2,4,5	0,056	0,571	0,8615	0,021	16,11
3	8,697	IP4 - 2,4,5,6	0,000	n.a.	0,0019	0,000	0,28
4	8,940	IP4 - 1,2,4,5	0,017	0,526	0,2934	0,005	4,22
5	10,017	IP4 - 2,3,4,5	0,128	0,457	0,8943	0,037	28,73
6	10,653	IP4 - 1,2,5,6	0,016	0,408	n.a.	0,004	3,24
7	13,430	IP5 - 1,2,3,4,5	0,062	0,490	0,3696	0,020	15,37
8	15,460	IP5 - 1,2,4,5,6	0,019	0,609	0,1241	0,007	5,24

In Abbildung 31 ist das Ergebnis der Probe sichtbar, die zunächst 60 Minuten mit dem *E.coli*-Enzym und anschließend 90 Minuten mit der *Bacillus*-Phytase inkubiert wurde.

Den Hauptbestandteil der detektierten Abbauprodukte bildet mit 51% (1,2313 mmol/l) das 2,4,5-IP3. Das nicht zu analysierende Abbauprodukt wird durch einen großen Peak im Chromatogramm dargestellt, die Menge konnte aber nicht analysiert werden. Des Weiteren wurden in absteigender Menge folgende Inositolphosphate detektiert: 2,3,4,5-IP4 (0,5316 mmol/l), 1,2,3,4,5-IP5 (0,2713 mmol/l), 1,2,4,5-IP4 (0,3770 mmol/l), 1,2,5,6-IP4 (nicht analysiert) und 2,4,5,6-IP4 (0,0017 mmol/l) (siehe Tabelle 34). Die Summe Der Inositolphosphate beträgt in dieser Probe 2,4129 mmol/l.

Tabelle 34: Peak-Analyse Inositolphosphate nach Inkubation mit der *E.coli*-Phytase (60 min) und der *Bacillus*-Phytase (90 min)

No.	Ret.Time min	Peakname	Height mAU	Width min	Amount mmol/l	Area mAU*min	Rel.Area %
1	1,180	n.a.	0,078	0,545	n.a.	0,030	28,01
2	5,817	IP3 -2,4,5	0,085	0,555	1,2313	0,030	27,28
3	8,637	IP4 - 2,4,5,6	0,002	0,181	0,0017	0,000	0,29
4	8,980	IP4 - 1,2,4,5	0,023	0,556	0,3770	0,007	6,43
5	10,027	IP4 - 2,3,4,5	0,080	0,439	0,5316	0,022	20,24
6	10,643	IP4 - 1,2,5,6	0,019	0,402	n.a.	0,005	4,38
7	13,437	IP5 - 1,2,3,4,5	0,044	0,491	0,2713	0,015	13,37

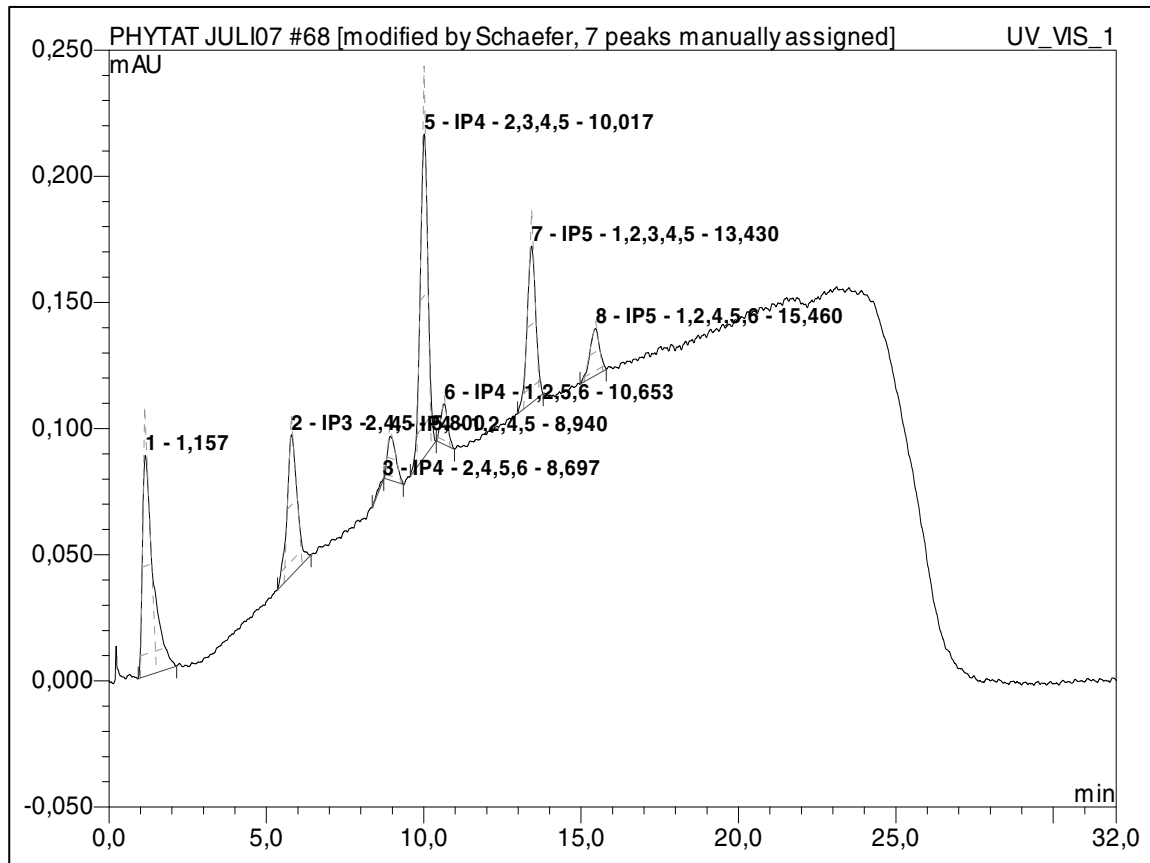


Abbildung 30: Inositolphosphate nach Inkubation mit der *E.coli*-Phytase (60 min) und der *Bacillus*-Phytase (45 min)

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der sequentiellen Inkubation der *E.coli*- und der *Bacillus*-Phytase mit dem Substrat Natriumphytat noch einmal auf prozentualer molarer Basis zusammengefasst dargestellt:

Hauptabbauprodukt nach einstündiger Inkubation mit dem *E.coli*-Enzym ist das IP4. Von dem Substrat IP6 ist noch ein Anteil von etwa 12% vorhanden.

Nach der 45-minütigen Inkubation der *E.coli*-Abbauprodukte mit dem *Bacillus*-Enzym ist das Substrat IP6 vollständig verschwunden. Den Hauptanteil der Inositolphosphate bildet das IP4, aber auch der Anteil des IP3 ist von ca. 15% auf etwa das Doppelte angestiegen. Nach 90 Minuten ist das Hauptabbauprodukt der *Bacillus*-Phytase das IP3 (über 50% der Inositolphosphate), gefolgt vom IP4 mit einem Anteil von etwa 37%. Vom IP5 sind nur noch etwa 10% in der Probe enthalten.

# E R G E B N I S S E

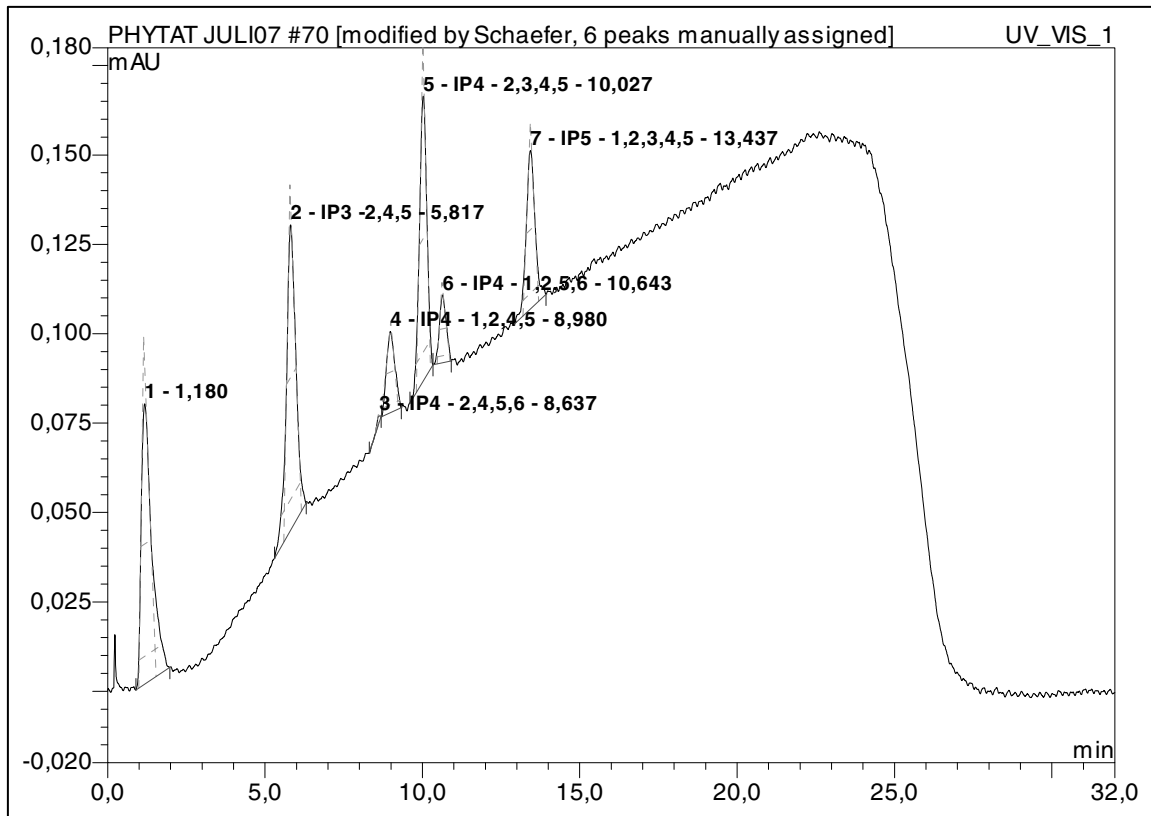


Abbildung 31: Inositolphosphate nach Inkubation mit der *E.coli*-Phytase (60 min) und der *Bacillus*-Phytase (90 min)

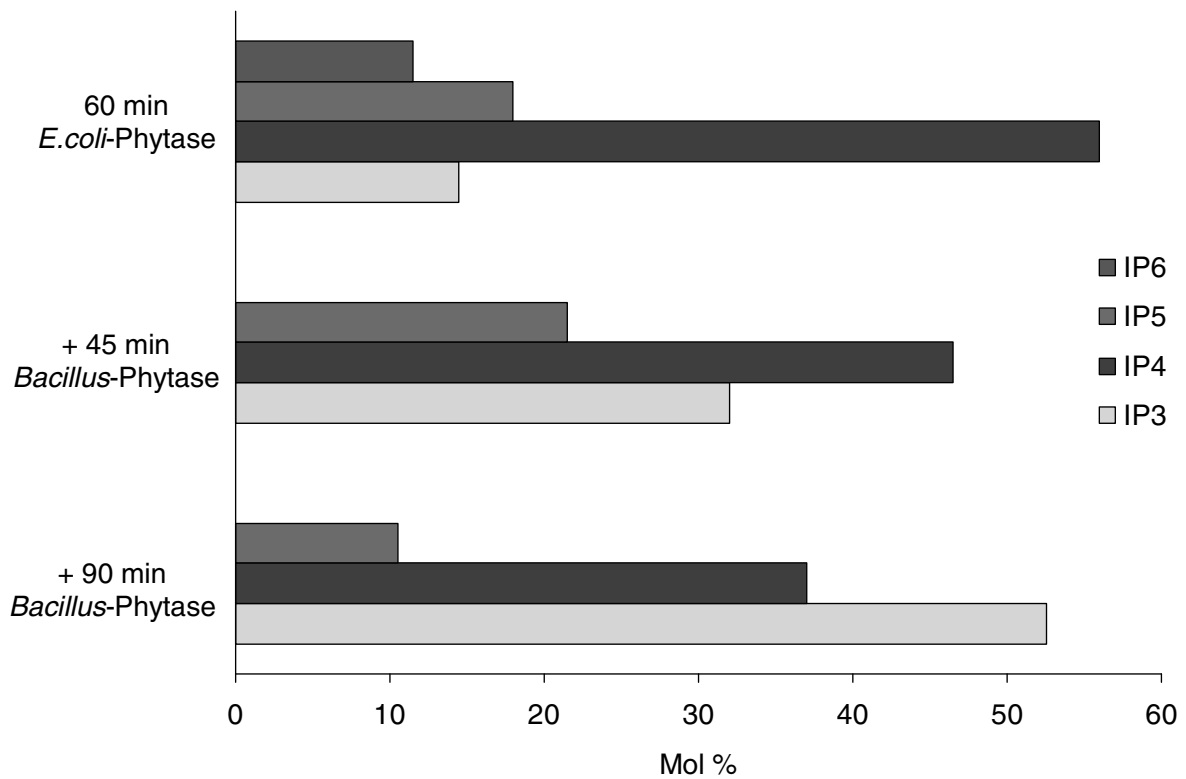


Abbildung 32: Produkte aus dem sequentiellen Phytatabbau durch eine *E.coli*- und eine *Bacillus*-Phytase

#### 4.6.5 *In-vivo*-Versuch: Effizienz der *E.coli*-Phytase Optiphos auf Gesundheit, Leistung und P- und Ca- Verdaulichkeit bei Absetzferkeln

##### 4.6.5.1 Analyse der Diäten

Die Ergebnisse der Analysen der Diäten sind in Tabelle 35 aufgeführt. Die Analysedaten der Diäten stimmen mit den errechneten Werten (siehe Tabelle 9) überein.

Tabelle 35: Analyseergebnisse der Diäten

Phytase supplementation		Diät A Kontrolle	Diät B Optiphos	Diät C Natuphos®
Umsetzbare Energie	MJ/kg	13.66	13.62	13.64
Rohprotein (XP)	g/kg	209.90	211.60	212.30
Rohfaser (XF)	g/kg	35.50	38.10	36.10
Rohfett (XL)	g/kg	33.70	34.10	33.80
Rohasche	g/kg	54.00	55.50	52.10
Stärke (XS)	g/kg	407.90	405.20	402.20
Zucker (XZ)	g/kg	38.10	37.80	38.50
Kalzium	g/kg	7.20	7.60	8.00
Gesamtposphor	g/kg	3.30	3.40	3.50
Natrium	g/kg	1.80	1.80	1.80
Chromoxid	g/kg	5.40	5.10	5.00

In Tabelle 36 sind die Ergebnisse der Phytaseaktivitätsbestimmung in den Diäten aufgeführt. Der Enzymgehalt in den Diäten war höher als erwartet, was daran liegen mag, dass die Enzymaktivitäten in den Rohenzymen höher waren als tatsächlich angegeben (siehe Tabelle 10, Abschnitt 4.1).

Tabelle 36: Phytaseaktivitäten der Diäten (Durchschnittswerte)

	Optiphos (FTU/kg)		Natuphos® (FTU/kg)	
	geplant	analysiert	geplant	analysiert
Diät A	-	< 50	-	< 50
Diät B	1300	1989	-	-
Diät C	-	-	1300	1929

Die täglich zusammengemischten Rationen für die einzelnen Gruppen mit und ohne Phytasezusatz wurden berechnet, indem die analysierte Phytaseaktivität der Diäten B und C als Basis zugrunde gelegt wurde. Die exemplarische Berechnung für die Verifizierung der verschiedenen Enzymaktivitäten ist in Tabelle 37 für jeweils 1,0 kg Futter dargestellt.

Tabelle 37: Exemplarische Standardberechnung für das Mischen der Diäten je Gruppe zwecks Einhaltung der beabsichtigten Phytaseaktivitäten in 1000 g Futter

	<i>Diät A (g)</i> Kontrolle	<i>Diät B (g)</i> <i>Optiphos*</i>	<i>Diät C (g)</i> <i>Natuphos**</i>	<i>Diät je Box (g)</i> Total
0 FTU/kg (Kontrolle)	1000	-	-	1000
125 FTU/kg (Optiphos)	937	63	-	1000
250 FTU/kg (Optiphos)	874	126	-	1000
500 FTU/kg (Optiphos)	749	251	-	1000
1000 FTU/kg (Optiphos)	497	503	-	1000
125 FTU/kg (Natuphos)	935	-	65	1000
250 FTU/kg (Natuphos)	870	-	130	1000
500 FTU/kg (Natuphos)	741	-	259	1000
1000 FTU/kg (Natuphos)	482	-	518	1000

\* 1989 FTU/kg; \*\* 1929 FTU/kg

#### 4.6.5.2 Leistung

Während der gesamten Versuchsdauer waren alle Ferkel gesund und klinisch unauffällig. Die Leistungsparameter früh abgesetzter Ferkel während der sechswöchigen Versuchsperiode vom 24. bis zum 65. Lebenstag sind in Tabelle 38 periodisch zusammengefasst dargestellt.

##### 4.6.5.2.1 Gewichtszunahme

Das durchschnittliche Körpergewicht der mit un-supplementierter Diät (A = Negativkontrolle) gefütterten Ferkel nahm während der sechswöchigen Versuchsperiode von 6,13 kg auf 14,31 kg zu, was einer durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahme von 195 g entspricht. Das Körpergewicht der Ferkel, die mit phytasehaltigem Futter gefüttert wurden, betrug am Versuchsende im Durchschnitt 16,81 kg. Es handelt sich hierbei zwar um eine Verbesserung der Gewichtszunahme - verglichen mit der Negativkontrolle - aber immer noch um eine geringere Gewichtszunahme als bei Versuchen, bei denen die Ferkel mit Diäten gefüttert wurden, bei welchen die empfohlenen Ca- und P-Gehalte vorlagen. In diesem Versuch war das verzögerte Wachstum zu erwarten und erwünscht, um sicherstellen zu können, dass die Phosphor-Verdaulichkeit unter suboptimaler Phosphorversorgung bestimmt werden konnte.

Nach gestaffelter Zugabe der Optiphos-Phytase steigerte sich die Gewichtszunahme dosisabhängig von 12,7% bei 125 FTU/kg bis zu 40,2% bei Zugabe von 1000 FTU/kg, verglichen mit der Negativkontrolle. Die Differenz war jedoch nur bei 1000 FTU/kg signifikant. Bei entsprechend gestaffelter Zugabe von Natuphos®-Phytase zu den Diäten war die Gewichtszunahme um 13,8% bis 42,1% höher, als es bei der Negativkontrolle zu beobachten war. Die Gewichtszunahme wurde - verglichen mit der Negativkontrolle - bei Supplementierung von 250 FTU/kg und 1000 FTU/ kg signifikant verbessert.

Der positive Effekt auf die Gewichtszunahme war bei beiden Phytasen am ausgeprägtesten während der dritten bis sechsten Woche des Experiments. Die Gewichtszunahmen waren bei Fütterung von Optiphos mit Aktivitäten von 250, 500 und 1000 FTU/kg mit Werten von 40,4% (nicht signifikant), 43,3% (signifikant) und 46,3% (signifikant) höher als bei der Negativkontrolle (p 0,05, Tukey-Test).



Bei Zugabe von 250, 500 und 1000 FTU/kg Natuphos® zu den Diäten waren die Gewichtszunahmen um 46,7% (signifikant), 38,1% (nicht signifikant) und 47,7% (signifikant) höher als bei der Negativkontrolle (p 0,05, Tukey-Test).

Die Gewichtszunahme der Ferkel, deren Futter mit 125 FTU/kg Phytase supplementiert war, wurde nur numerisch um 18,9% (Optiphos) bzw. 16,1% (Natuphos®) erhöht.

Die Effekte der beiden Phytasen auf die Gewichtszunahme sind in Abbildungen 33 und 34 als Polynomfunktionen aufgezeigt. Die kalkulierten optimalen Effekte bei Phytaseaktivitäten von 700 bis 800 FTU/kg im Futter mit den Bestimmtheitsmaßen von 0,65 bzw. 0,59 sind ebenfalls in den Abbildungen dargestellt.

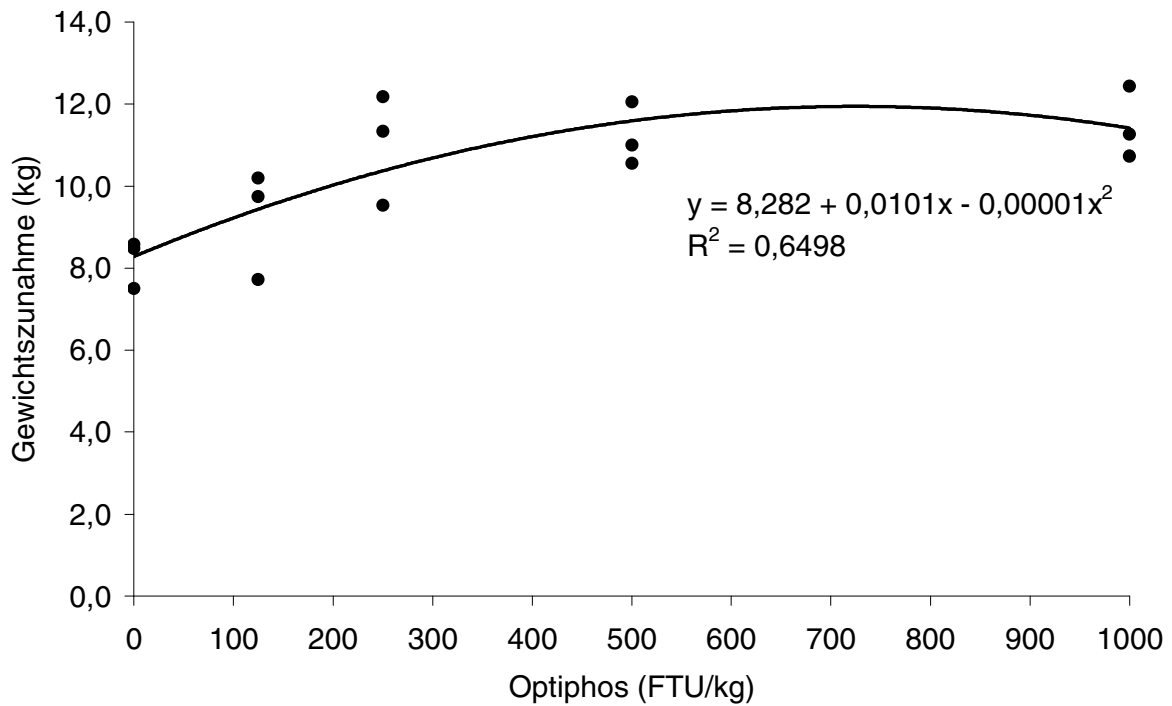


Abbildung 33: Effekt von Optiphos auf die Gewichtszunahme (24. bis 65. Lebenstag)

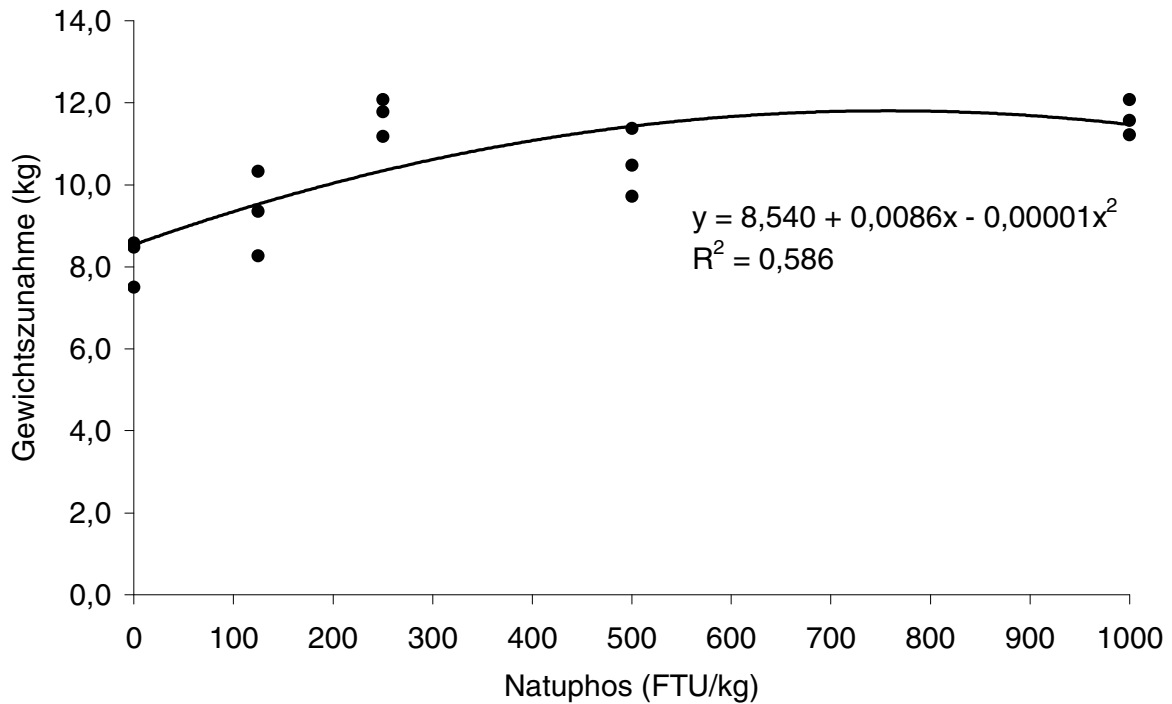


Abbildung 34: Effekt von Natuphos® auf die Gewichtszunahme (24. bis 65. Lebenstag)

#### 4.6.5.2.2 Futteraufnahme

Die tägliche Futteraufnahme lag bei den Ferkeln ohne Phytasesupplementation (Negativkontrolle) bei 360g je Ferkel. Mit Zugabe der Phytasen nahm die Futteraufnahme dosisabhängig zu bis auf 441g je Ferkel und Tag. Die tägliche Futteraufnahme der Ferkel in den Gruppen E und I (1000 FTU/kg) war signifikant höher ( $p < 0,05$ , Tukey-Test) als bei den Ferkeln aus Gruppe A (0 FTU/kg).

#### 4.6.5.2.3 Futteraufwand

Der Futteraufwand (kg Futter pro kg Gewichtszunahme) während der sechswöchigen Periode lag bei den Ferkeln ohne Phytasesupplementation bei 1,85. Mit Phytasesupplementation verbesserte sich der Futteraufwand numerisch. Die Effekte der beiden Phytasen sind mittels Polynomfunktionen in Abbildungen 35 und 36 beschrieben. Es ist eine hohe Dosiswirksamkeit bis hin zu 250 FTU/kg erkennbar. Die errechnete Optimaldosis liegt im Bereich von 600 bis 900 FTU/kg mit Bestimmtheitsmaßen von 0,52 (Optiphos) und 0,38 (Natuphos®).

# ERGEBNISSE

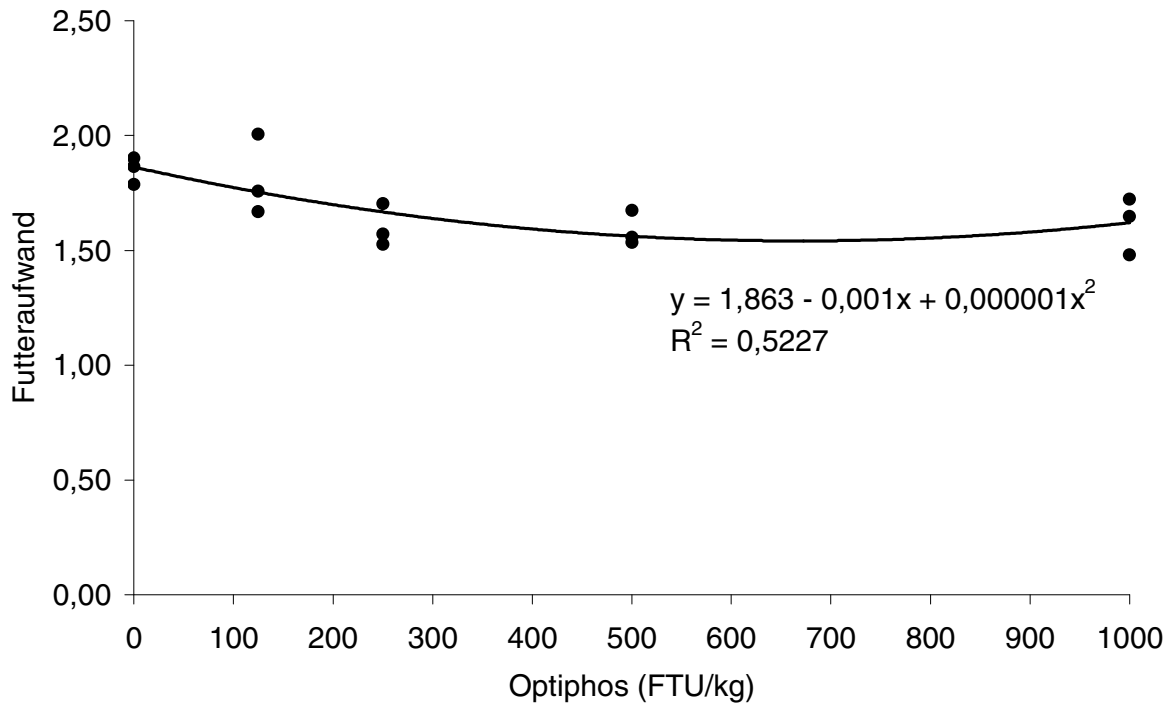


Abbildung 35: Effekt von Optiphos auf den Futteraufwand (kg Futter pro kg Gewichtszunahme), (24. bis 65. Lebenstag)

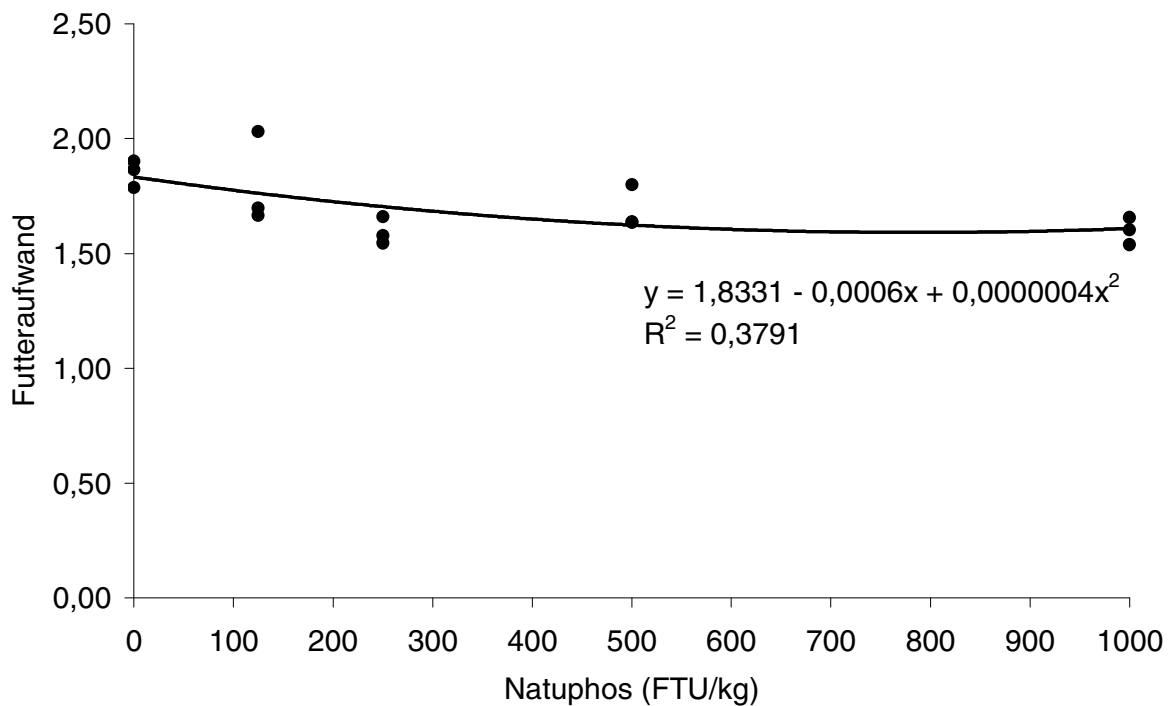


Abbildung 36: Effekt von Natuphos® auf den Futteraufwand (kg Futter pro kg Gewichtszunahme), (24. bis 65. Lebenstag)

#### 4.6.5.3 Konsistenz der Fäzes

Die täglich beobachtete Konsistenz der Fäzes lag im Durchschnitt über dem Wert 1 (fest). Es zeigten sich Abweichungen in der Kotkonsistenz, jedoch wurden keine schwerwiegenden Änderungen beobachtet. Hauptsächlich wurde Kot der Kategorien 2 (weich geformt) und 3 (weich ungeformt) vorgefunden. Es wurden keine augenscheinlichen Effekte der unterschiedlichen Diäten festgestellt. Die Anzahl der Ferkel war zu gering, um mögliche Effekte der Diäten auf die Kotkonsistenz messen bzw. nachweisen zu können.

#### 4.6.5.4 Scheinbare Verdaulichkeit

##### 4.6.5.4.1 Scheinbare Phosphorverdaulichkeit

Die bakterielle *E.coli*-Phytase und die pilzliche *Aspergillus*-Phytase wurden der phosphorarmen Diät zugesetzt, um die Effizienz dieser Phytasen bei früh abgesetzten Ferkeln zu ermitteln.

Die rektal entnommenen Fäzesproben wurden vom 40. bis 45. Tag und vom 60. bis 65. Tag des Versuchs entnommen, und um die Verdaulichkeit messen zu können, wurde ein inerte, unverdaulicher Marker (Chromoxid) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 39 dargestellt. Insgesamt ist zu sagen, dass die scheinbare P-Verdaulichkeit altersabhängige Effekte zeigte. Die während des 40.-45. Tages gemessenen Verdaulichkeits-Werte waren geringfügig niedriger als während des 60.-65. Tages. Beide Phytasen verbesserten die P-Verdaulichkeit in den zwei Versuchsperioden (40.-45. und 60.-65. Tag) in gestaffeltem Maße. Von 250 FTU/kg aufwärts sind alle Mittelwerte signifikant höher als die der Negativkontrolle.

Im Bereich von 125 bis 500 FTU/kg war die *E.coli*-Phytase ein wenig effizienter als die pilzliche *Aspergillus*-Phytase, obgleich die Unterschiede zwischen beiden Enzymen nur in der Periode 60.-65. Tag bei 250 FTU/kg signifikant waren. Bei 1000 FTU/kg zeigte sich zwar Natuphos® überlegen, jedoch waren die Unterschiede verglichen mit dem Ergebnis von Optiphos nicht signifikant. Die Effekte der Phytasen auf die P-Verdaulichkeit sind in den Abbildungen 37 bis 40 dargestellt.

Aufgrund der Tatsache, dass die Effizienz der *E.coli*-Phytase im Bereich von 125 bis 500 FTU/kg höher war als die der pilzlichen Phytase, sind die Regressionskurven für beide Versuchsperioden bei Optiphos Polynomfunktionen mit verhältnismäßig hohen Bestimmtheitsmaßen (0,82 und 0,73). Die für eine Verbesserung der scheinbaren Verdaulichkeit optimalerweise einzusetzende Dosis für das *E.coli*-Enzym liegt bei 800 FTU/kg.

Wegen des größeren positiven Effekts von Natuphos® auf die P-Verdaulichkeit bei 1000 FTU/kg wurden die Ergebnisse durch lineare Funktionen dargestellt, mit der Konsequenz, dass für die *Aspergillus*-Phytase keine optimale Dosis gefunden wurde.

Tabelle 38: Periodisch zusammengefasste Leistungsparameter früh abgesetzter Ferkel während der sechswöchigen Versuchsperiode vom 24. bis zum 65. Lebenstag (Werte je Ferkel)

Gruppe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Ferkel	n	6	6	6	6	6	6	6	6
Wiederholungen	n	3	3	3	3	3	3	3	3
Optiphos	FTU/kg	125	250	500	1000	-	-	-	-
Natuphos®	FTU/kg	-	-	-	-	125	250	500	1000
<b>1.-2. Woche</b>									
Ferkel	n	6	6	6	6	6	6	6	6
Körpergewicht	kg								
- Versuchsstart		6,13 ± 0,45	6,14 ± 0,19	5,96 ± 0,76	6,16 ± 0,33	5,92 ± 0,59	6,11 ± 0,56	6,08 ± 0,40	5,95 ± 0,07
- Versuchsende		7,48 ± 0,22	7,24 ± 0,22	7,37 ± 0,75	7,65 ± 0,09	7,31 ± 0,53	7,76 ± 0,48	7,17 ± 0,82	7,48 ± 0,32
Gewichtszunahme	kg	1,35 ± 0,28	1,10 ± 0,34	1,41 ± 0,04	1,49 ± 0,36	1,38 ± 0,16	1,66 ± 0,12	1,09 ± 0,57	1,53 ± 0,35
Relativ	%	100	81,5	104,4	110,4	102,2	123,0	80,7	113,3
Futteraufnahme	kg	2,45 ± 0,14	2,20 ± 0,55	2,38 ± 0,20	2,49 ± 0,50	2,49 ± 0,13	2,56 ± 0,03	2,25 ± 0,52	2,52 ± 0,14
Futteraufwand*	kg	1,885 ± 0,512	2,041 ± 0,230	1,689 ± 0,132	1,730 ± 0,343	1,814 ± 0,133	1,600 ± 0,090	2,416 ± 0	1,700 ± 0,331
Relativ	%	100	108,3	89,6	91,8	96,2	84,9	128,2	90,2
<b>3.-6. Woche</b>									
Ferkel	n	6	6	6	6	6	6	6	6
Körpergewicht	kg								
- Versuchsstart		7,48 ± 0,22	7,24 ± 0,22	7,37 ± 0,75	7,65 ± 0,09	7,31 ± 0,53	7,76 ± 0,48	7,17 ± 0,82	7,48 ± 0,32
- Versuchsende		14,31 ± 0,95 <sup>a</sup>	15,37 ± 1,26 <sup>ab</sup>	17,16 ± 1,52 <sup>ab</sup>	17,63 ± 0,81 <sup>ab</sup>	15,24 ± 1,03 <sup>ab</sup>	17,78 ± 1,01 <sup>b</sup>	16,60 ± 1,14 <sup>ab</sup>	17,57 ± 0,37 <sup>ab</sup>
Gewichtszunahme	kg	6,83 ± 0,73 <sup>a</sup>	8,12 ± 1,04 <sup>ab</sup>	9,79 ± 0,80 <sup>b</sup>	9,99 ± 0,72 <sup>b</sup>	7,93 ± 0,88 <sup>ab</sup>	10,02 ± 0,56 <sup>b</sup>	9,43 ± 0,32 <sup>ab</sup>	10,09 ± 0,47 <sup>b</sup>
Relativ	%	100	118,9	143,3	146,3	116,1	146,7	138,1	147,7
Futteraufnahme	kg	12,68 ± 0,84 <sup>a</sup>	14,33 ± 0,37 <sup>ab</sup>	15,39 ± 0,99 <sup>ab</sup>	15,99 ± 0,22 <sup>b</sup>	14,13 ± 0,96 <sup>ab</sup>	15,68 ± 0,56 <sup>b</sup>	15,49 ± 0,72 <sup>b</sup>	16,03 ± 0,12 <sup>b</sup>
Futteraufwand*	kg	1,862 ± 0,080	1,781 ± 0,196	1,574 ± 0,078	1,607 ± 0,114	1,794 ± 0,215	1,566 ± 0,033	1,643 ± 0,061	1,591 ± 0,071
Relativ	%	100	95,6	84,5	86,3	96,3	84,1	88,2	85,4
<b>1.-6. Woche</b>									
Ferkel	n	6	6	6	6	6	6	6	6
Körpergewicht	kg								
- Versuchsstart		6,13 ± 0,45	6,14 ± 0,19	5,96 ± 0,76	6,16 ± 0,33	5,92 ± 0,59	6,11 ± 0,56	6,08 ± 0,40	5,95 ± 0,07
- Versuchsende		14,31 ± 0,95 <sup>a</sup>	15,37 ± 1,26 <sup>ab</sup>	17,16 ± 1,52 <sup>ab</sup>	17,63 ± 0,81 <sup>ab</sup>	15,24 ± 1,03 <sup>ab</sup>	17,78 ± 1,01 <sup>b</sup>	16,60 ± 1,14 <sup>ab</sup>	17,57 ± 0,37 <sup>ab</sup>
Gewichtszunahme	kg	8,18 ± 0,59 <sup>a</sup>	9,22 ± 1,32 <sup>ab</sup>	11,20 ± 0,77 <sup>ab</sup>	11,47 ± 0,88 <sup>b</sup>	9,31 ± 1,03 <sup>ab</sup>	11,67 ± 0,46 <sup>b</sup>	10,52 ± 0,83 <sup>ab</sup>	11,62 ± 0,43 <sup>b</sup>
Relativ	%	100	112,7	136,9	140,2	113,8	142,7	128,6	142,1
Futteraufnahme	kg	15,13 ± 0,79 <sup>a</sup>	16,53 ± 0,91 <sup>ab</sup>	17,77 ± 1,17 <sup>ab</sup>	18,48 ± 0,07 <sup>b</sup>	16,62 ± 0,99 <sup>ab</sup>	18,60 ± 0,05 <sup>b</sup>	17,74 ± 0,76 <sup>ab</sup>	18,55 ± 0,03 <sup>b</sup>
Futteraufwand*	kg	1,851 ± 0,058	1,810 ± 0,175	1,588 ± 0,055	1,617 ± 0,124	1,797 ± 0,202	1,594 ± 0,059	1,690 ± 0,083	1,599 ± 0,059
Relativ	%	100	97,8	85,8	87,4	97,1	86,1	91,3	86,4

\* kg Futter je kg Körpermassezunahme

<sup>ab</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile sind signifikant unterschieden (p ≤ 0,05; Tukey-Test)

Tabelle 39: P- Ca- und Ra-Verdaulichkeit früh abgesetzter Ferkel vom 40. bis 45. und 60. bis 65. Lebenstag (Werte je Ferkel)

Gruppe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Ferkel	n	6	6	6	6	6	6	6	6
Wiederholungen	n	6	6	6	6	6	6	6	6
Optiphos	FTU/kg	125	250	500	1000	-	-	-	-
Natuphos®	FTU/kg	-	-	-	-	125	250	500	1000
<b>40 bis 45-Lebenstag</b>									
Verdaulichkeit	%								
Phosphor		19,26 ± 2,44 <sup>a</sup>	36,40 ± 6,98 <sup>cde</sup>	40,16 ± 4,04 <sup>de</sup>	47,31 ± 4,38 <sup>ef</sup>	24,57 ± 4,86 <sup>ab</sup>	32,55 ± 2,24 <sup>bcd</sup>	35,88 ± 9,54 <sup>bcd</sup>	51,77 ± 6,96 <sup>f</sup>
Relativ	100	135,2	190,0	208,5	245,6	127,5	169,0	186,3	288,8
Calcium		32,88 ± 7,23 <sup>a</sup>	50,14 ± 6,67 <sup>bc</sup>	53,64 ± 4,39 <sup>c</sup>	53,04 ± 4,52 <sup>c</sup>	41,25 ± 3,50 <sup>ab</sup>	53,09 ± 5,65 <sup>c</sup>	53,97 ± 8,68 <sup>c</sup>	53,23 ± 4,83 <sup>c</sup>
Relativ	100	129,5	152,5	163,1	161,3	125,5	161,5	164,1	161,9
Rohasche		40,69 ± 3,14 <sup>a</sup>	46,24 ± 5,18 <sup>ab</sup>	46,74 ± 3,35 <sup>ab</sup>	48,75 ± 1,83 <sup>b</sup>	42,77 ± 2,85 <sup>ab</sup>	45,54 ± 4,48 <sup>ab</sup>	44,33 ± 6,42 <sup>ab</sup>	49,10 ± 3,77 <sup>b</sup>
Relativ	100	103,6	113,6	114,9	119,8	104,6	111,9	108,9	120,7
<b>60 bis 65-Lebenstag</b>									
Verdaulichkeit	%								
Phosphor		23,01 ± 3,80 <sup>a</sup>	44,88 ± 5,02 <sup>de</sup>	43,82 ± 4,60 <sup>cd</sup>	45,89 ± 4,53 <sup>de</sup>	28,55 ± 3,19 <sup>ab</sup>	35,90 ± 3,93 <sup>bc</sup>	36,25 ± 7,36 <sup>bc</sup>	52,72 ± 3,65 <sup>e</sup>
Relativ	100	117,3	195,0	190,4	199,4	124,0	156,0	157,5	229,1
Calcium		42,87 ± 1,06 <sup>a</sup>	59,50 ± 5,28 <sup>b</sup>	58,41 ± 3,88 <sup>b</sup>	59,52 ± 4,14 <sup>b</sup>	53,96 ± 2,38 <sup>b</sup>	57,26 ± 3,08 <sup>b</sup>	52,71 ± 6,39 <sup>b</sup>	60,16 ± 3,68 <sup>b</sup>
Relativ	100	135,7	138,8	136,2	138,8	125,9	133,6	122,9	140,3
Rohasche		44,16 ± 3,23 <sup>a</sup>	49,42 ± 3,17 <sup>ab</sup>	48,85 ± 3,09 <sup>ab</sup>	52,07 ± 4,41 <sup>b</sup>	46,01 ± 2,05 <sup>ab</sup>	49,56 ± 1,83 <sup>ab</sup>	47,41 ± 5,85 <sup>ab</sup>	52,17 ± 2,92 <sup>b</sup>
Relativ	100	101,2	111,9	110,6	117,9	104,2	112,2	107,4	118,1

<sup>ab</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile sind signifikant unterschieden ( $p \leq 0,05$ ; Tukey-Test)

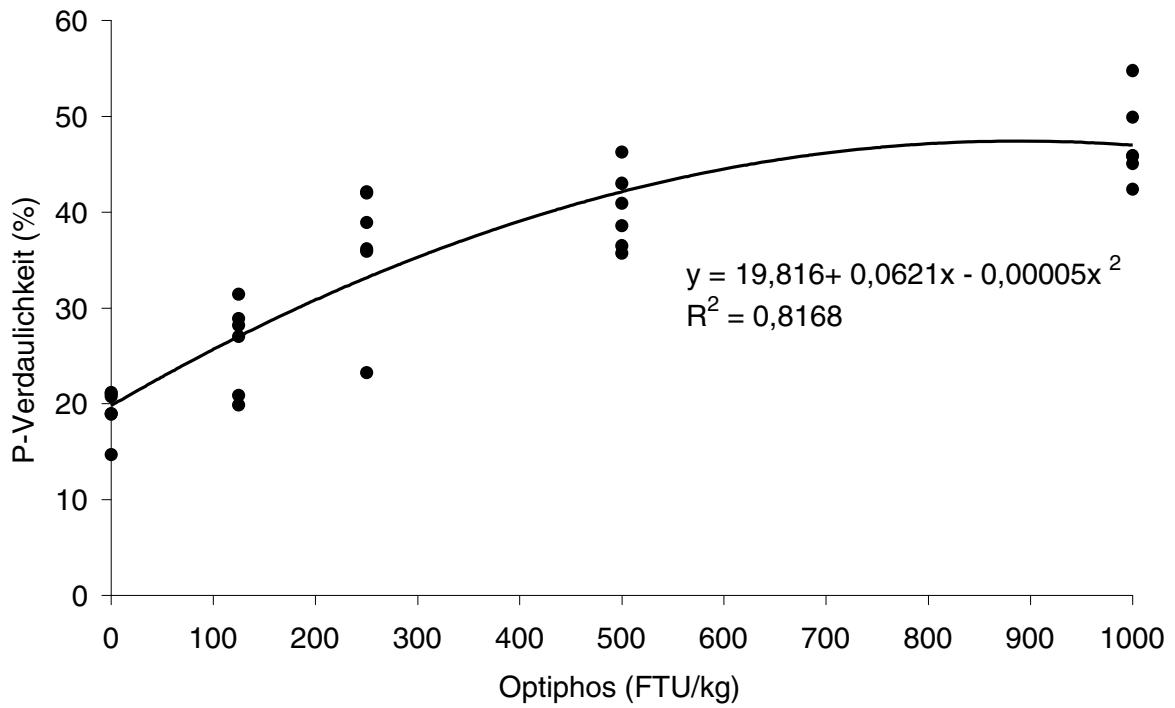


Abbildung 37: Effekt von Optiphos auf die P-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag)

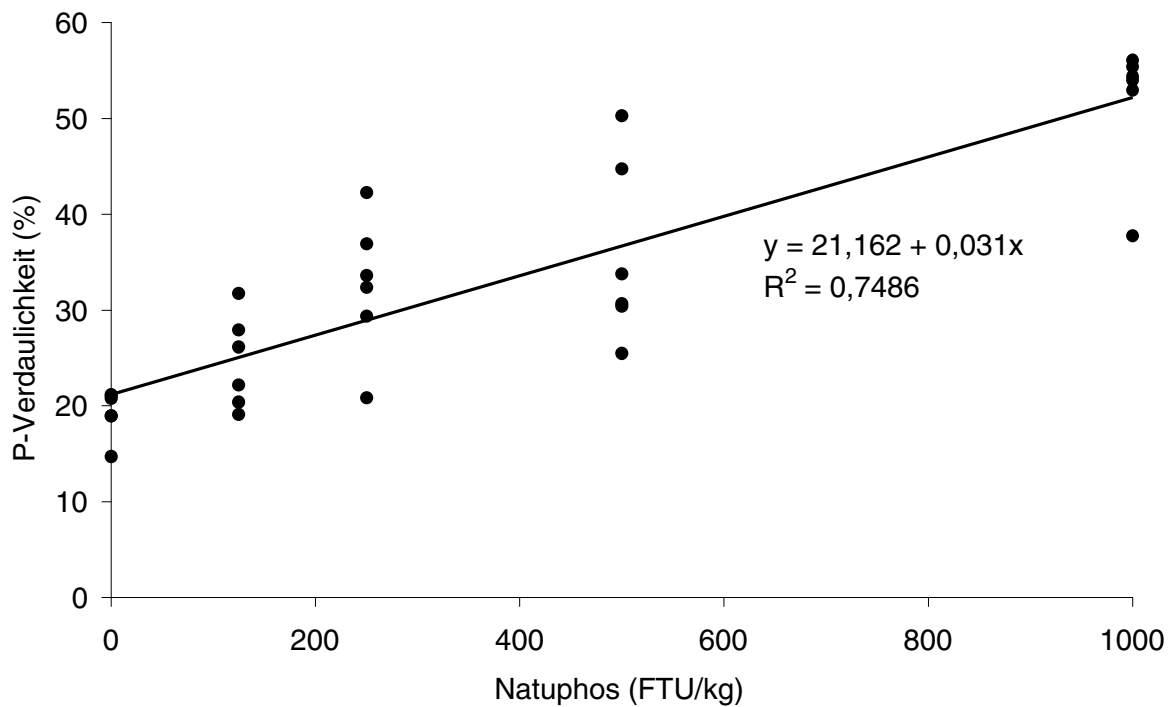


Abbildung 38: Effekt von Natuphos® auf die P-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag)

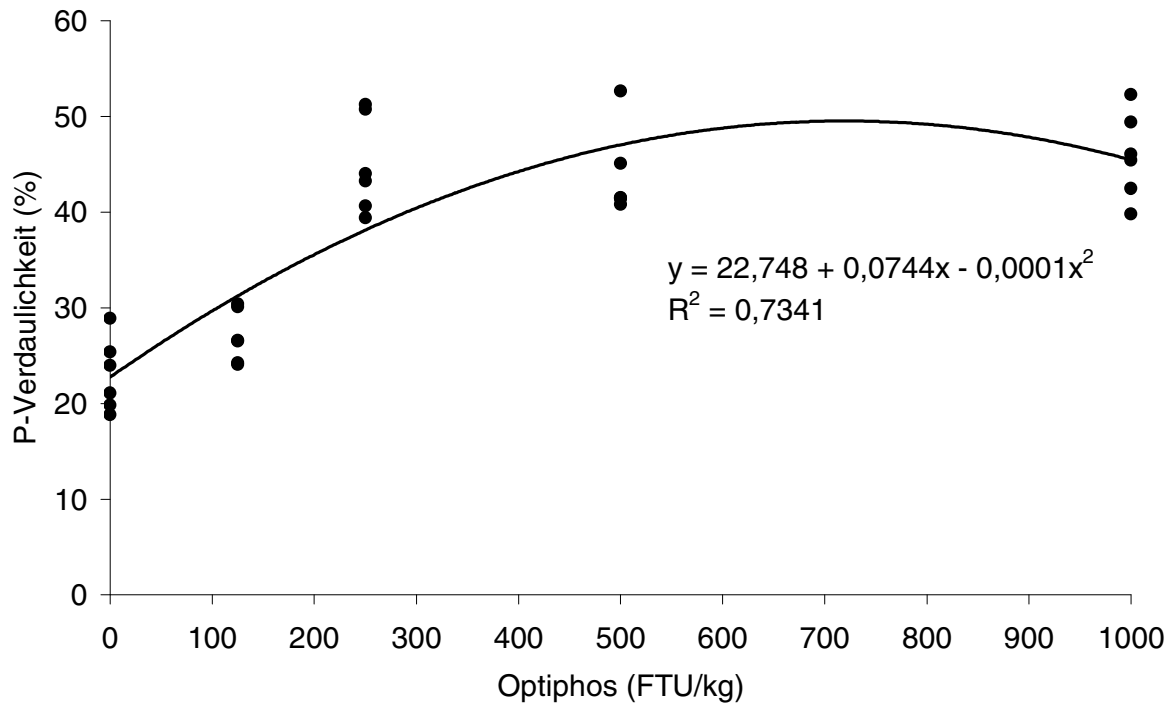


Abbildung 39: Effekt von Optiphos auf die P-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebensstag)

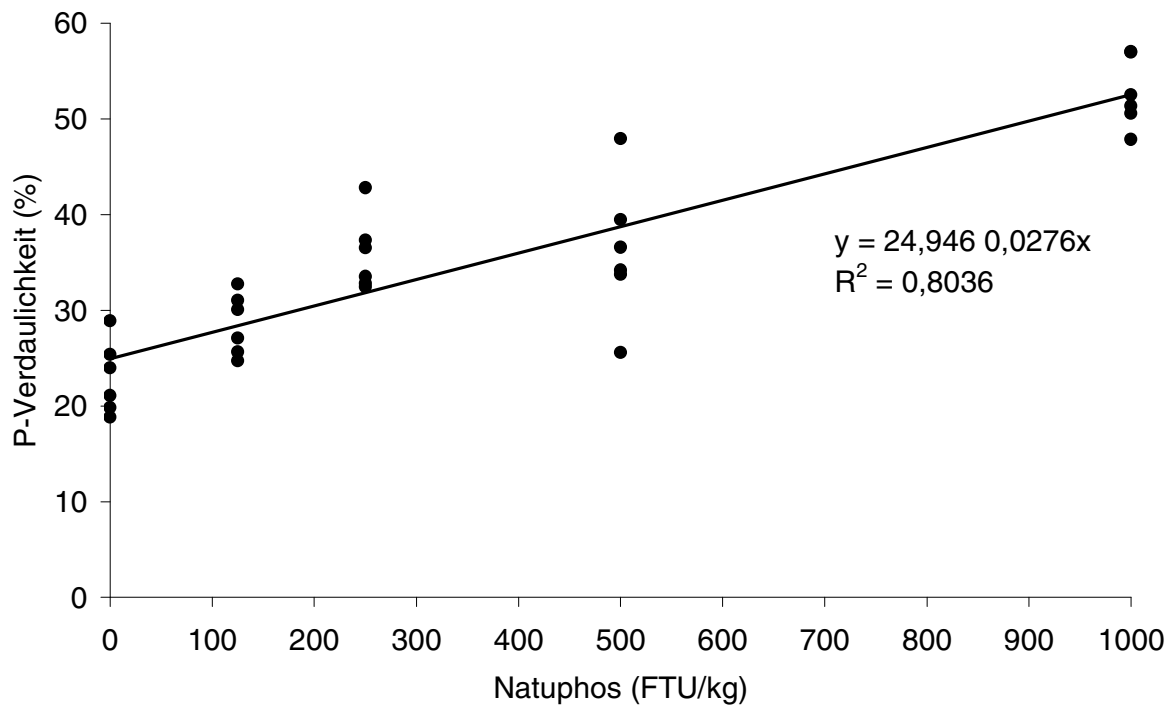


Abbildung 40: Effekt von Natuphos® auf die P-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebensstag)



Mittels des für die Negativkontrolle gemessenen Anteils verfügbaren Phosphors mit einem analysierten Phosphorgehalt von 3,3 g/kg Futter und einer Verdaulichkeit von 19,3% (40.-45. Lebenstag) und 23,0% (60.-65. Lebenstag) wurde der aus Phytat freigesetzte Phosphor für die verschiedenen Gruppen berechnet. Der je kg Futter aus Phytat freigesetzte Phosphor stieg im Zusammenhang mit abgestuften Gehalten an Phytase von 0,22g bis zu 0,93g (0,13 bis 0,76g) für Optiphos und 0,18g bis 1,07g (0,18g bis 0,98g) für Natuphos® in der Periode 40.-45. Lebenstag (60.-65. Lebenstag) an.

In Abbildung 41 ist die Wirkung der *E.coli*- und der *Aspergillus*-Phytase auf die Phosphorverdaulichkeit noch einmal relativ zur Negativkontrolle aufgezeigt. Die *Aspergillus*-Phytase erzeugt eine nahezu lineare, aber weniger deutliche Steigerung der Phosphorverdaulichkeit. Die *E.coli*-Phytase führt schon mit geringeren Phytasekonzentrationen (250 FTU/kg und 500 FTU/kg Futter) zu einer besseren Phosphorverdaulichkeit bei den Absetzferkeln.

Zusätzlich wurde das Monocalciumphosphat-Äquivalent (MCP) bestimmt (MCP/kg: 220g P, Verdaulichkeit: 90%), indem der enzymatisch freigesetzte Phosphor als Basis genommen wurde. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 40 aufgeführt.

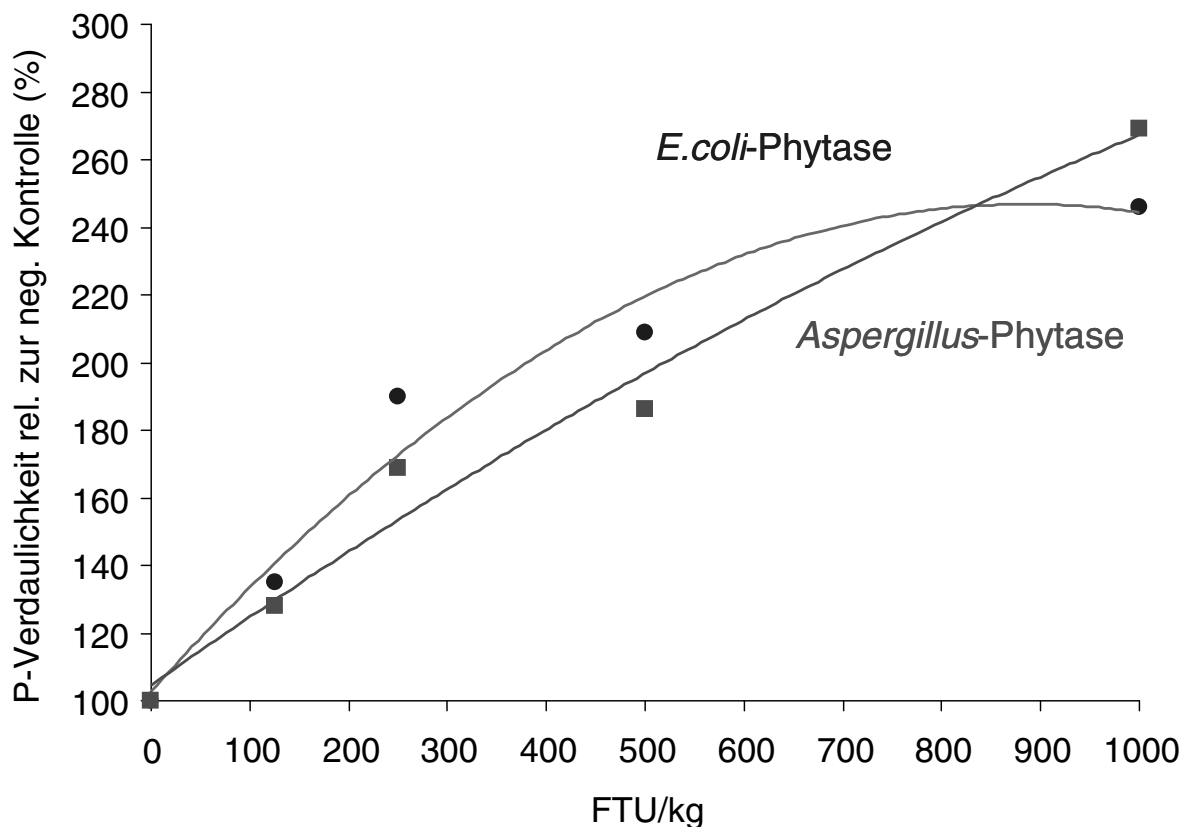


Abbildung 41: Wirksamkeit zweier Phytasen auf die P-Verdaulichkeit bei Ferkeln (40. bis 45. Lebenstag)

Tabelle 40: Phosphorfreisetzung aus Phytat und daraus errechnete Monocalciumphosphat (MCP)-Äquivalente

Gruppe		B	C	D	E	F	G	H	I
Ferkel	n	6	6	6	6	6	6	6	6
Wiederholungen	n	6	6	6	6	6	6	6	6
Optiphos	FTU/kg	125	250	500	1000	-	-	-	-
Natuphos®	FTU/kg	-	-	-	-	125	250	500	1000
<b>40' bis 45' Lebenstag</b>									
Freigesetzter Phytat-P	g/kg	0,22 ± 0,15 <sup>ab</sup>	0,57 ± 0,23 <sup>bcd</sup>	0,69 ± 0,13 <sup>cde</sup>	0,93 ± 0,15 <sup>de</sup>	0,18 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,24 <sup>abc</sup>	0,55 ± 0,32 <sup>abcd</sup>	1,07 ± 0,23 <sup>e</sup>
MCP-Äquivalent	g/kg	1,13 ± 0,77 <sup>ab</sup>	2,86 ± 1,16 <sup>bcd</sup>	3,49 ± 0,67 <sup>cde</sup>	4,68 ± 0,73 <sup>de</sup>	0,89 ± 0,81 <sup>a</sup>	2,22 ± 1,21 <sup>abc</sup>	2,77 ± 1,59 <sup>abcd</sup>	5,42 ± 1,16 <sup>e</sup>
<b>60' bis 65' Lebenstag</b>									
Freigesetzter Phytat-P	g/kg	0,13 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,17 <sup>de</sup>	0,69 ± 0,15 <sup>cd</sup>	0,76 ± 0,15 <sup>de</sup>	0,18 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,44 ± 0,13 <sup>bc</sup>	0,44 ± 0,25 <sup>bc</sup>	0,98 ± 0,12 <sup>e</sup>
MCP-Äquivalent	g/kg	0,67 ± 0,46 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,84 <sup>de</sup>	3,47 ± 0,77 <sup>cd</sup>	3,82 ± 0,75 <sup>de</sup>	0,93 ± 0,53 <sup>ab</sup>	2,15 ± 0,66 <sup>bc</sup>	2,21 ± 1,22 <sup>bc</sup>	4,95 ± 0,61 <sup>e</sup>

<sup>ab</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben innerhalb einer Zeile sind signifikant unterschieden ( $p \leq 0.05$ ; Tukey-Test)

**4.6.5.4.2 Scheinbare Calciumverdaulichkeit**

Die Ergebnisse der Ca-Verdaulichkeit (Tabelle 39) zeigen, dass beide Phytasen im Vergleich zur Negativkontrolle die Verdaulichkeit mit Abstufungen signifikant erhöht haben. Es zeigt sich aber, dass die Effizienz zahlenmäßig niedriger ausfällt als bei der P-Verdaulichkeit. In Übereinstimmung mit P war die Ca-Verdaulichkeit geringer und der positive Effekt der Phytasen somit höher bei jüngeren (40.-45. Lebenstag) als bei älteren Ferkeln (60.-65. Lebenstag).

Es wurden zudem nur geringe Leistungsunterschiede zwischen der bakteriellen und der pilzlichen Phytase gefunden, auch bei 1000 FTU/kg. Die Dosisabhängigkeit wird in den Abbildungen 42 bis 45 mit Polynomfunktionen mit den Bestimmtheitsmaßen von 0,44 bis 0,63 dargestellt. Die wirksamste Dosis für beide Perioden liegt bei Optiphos im Bereich von 600 bis 700 FTU/kg, für Natuphos scheint diese ein wenig höher zu liegen.

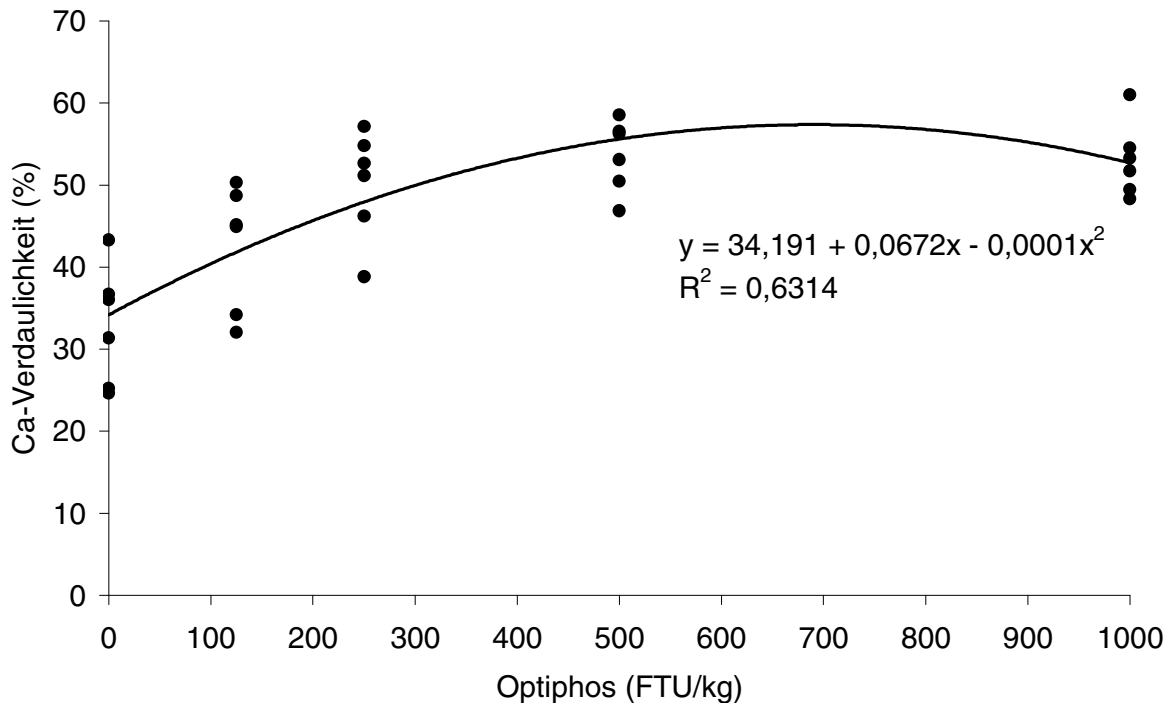


Abbildung 42: Effekt von Optiphos auf die Ca-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag)

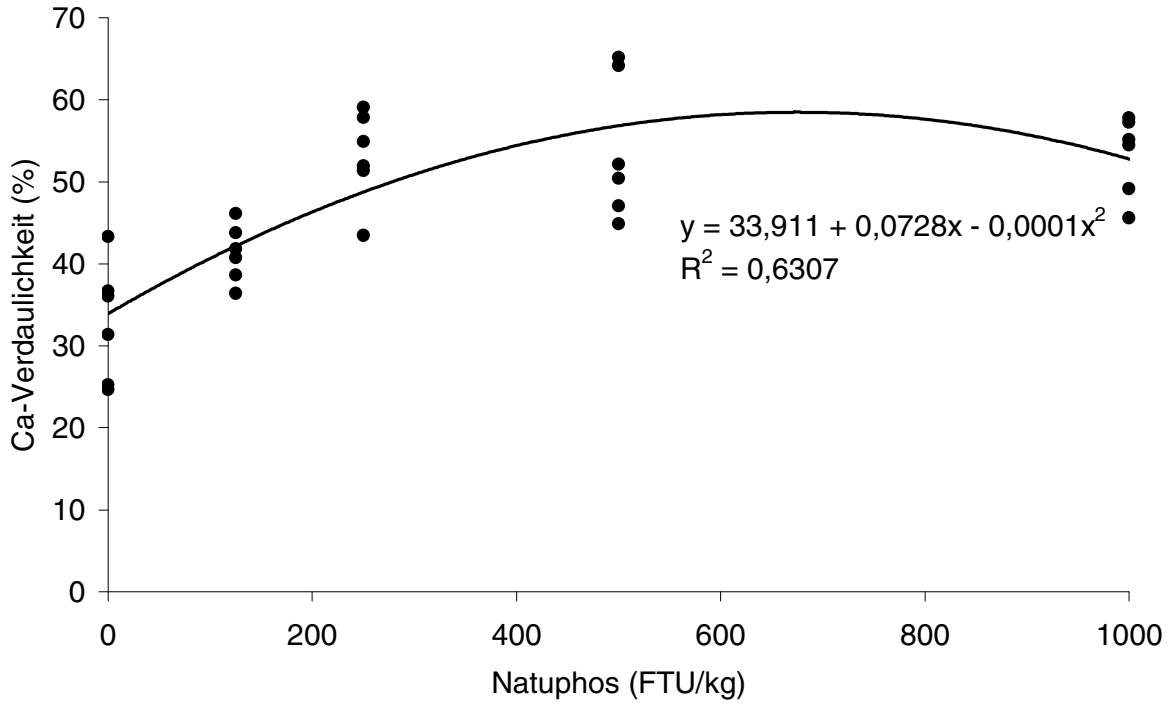


Abbildung 43: Effekt von Natuphos® auf die Ca-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag)

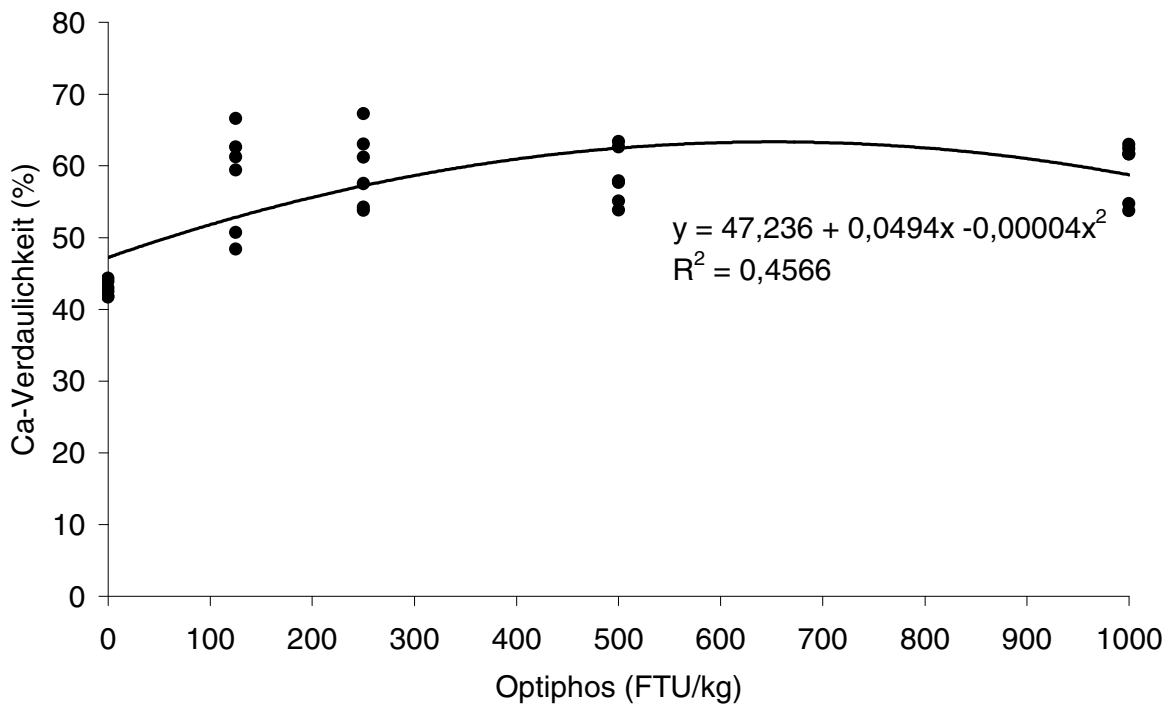


Abbildung 44: Effekt von Optiphos auf die Ca-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebenstag)

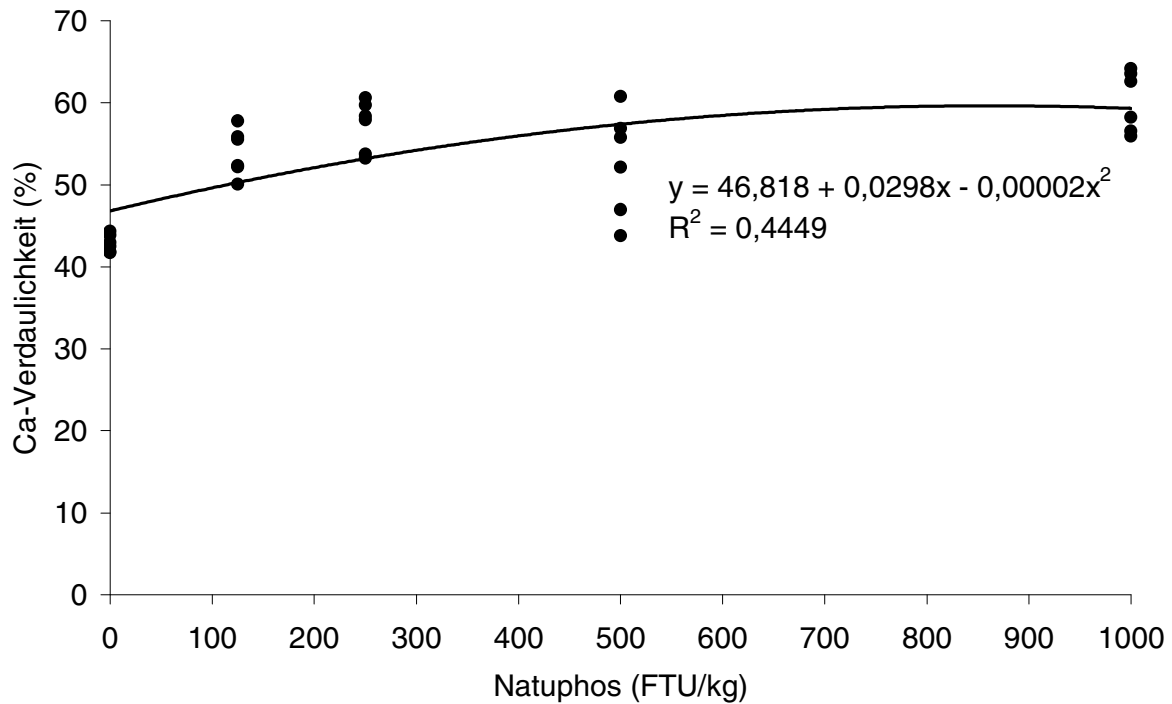


Abbildung 45: Effekt von Natuphos® auf die Ca-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebenstag)

#### 4.6.5.4.3 Rohasche-Verdaulichkeit

Auch die Rohasche (Ra)-Verdaulichkeit war in Übereinstimmung mit P und Ca bei jüngeren Ferkeln (40.-45. Lebenstag) geringer als bei älteren Ferkeln (60.-65. Lebenstag). Im Gegensatz dazu war die Effizienz beider Phytasen im Versuchsabschnitt 40.-45. Tag besser. Zudem war das dosisabhängige Potential von Optiphos und Natuphos® vergleichbar. Beide Phytasen verbesserten die Rohasche-Verdaulichkeit signifikant bei einer Dosis von 1000 FTU/kg, verglichen mit der Negativkontrolle. Die Supplementation von 125, 250 und 500 FTU/kg konnten die Verdaulichkeit nur numerisch, nicht jedoch signifikant verbessern. Aus diesem Grund sind die Funktionen, dargestellt in Abbildungen 46 bis 49, mehr linear als quadratisch. Es kann aus diesem Grund keine Optimaldosis ermittelt werden.

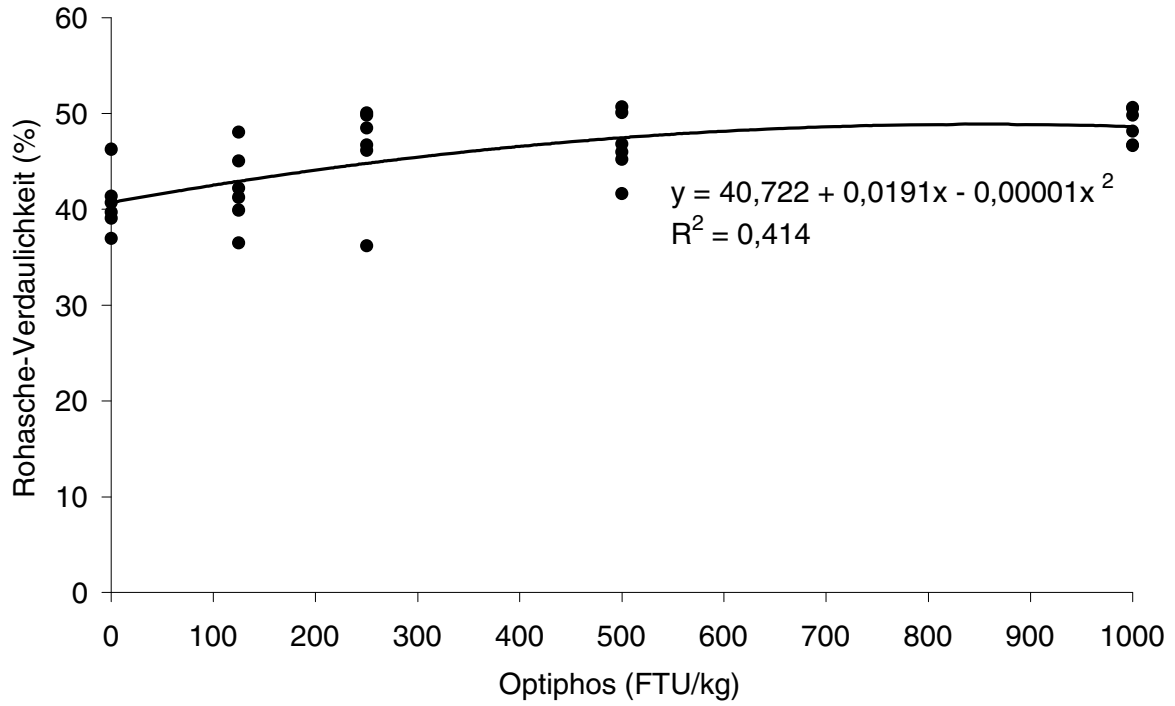


Abbildung 46: Effekt von Optiphos auf die Ra-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag)

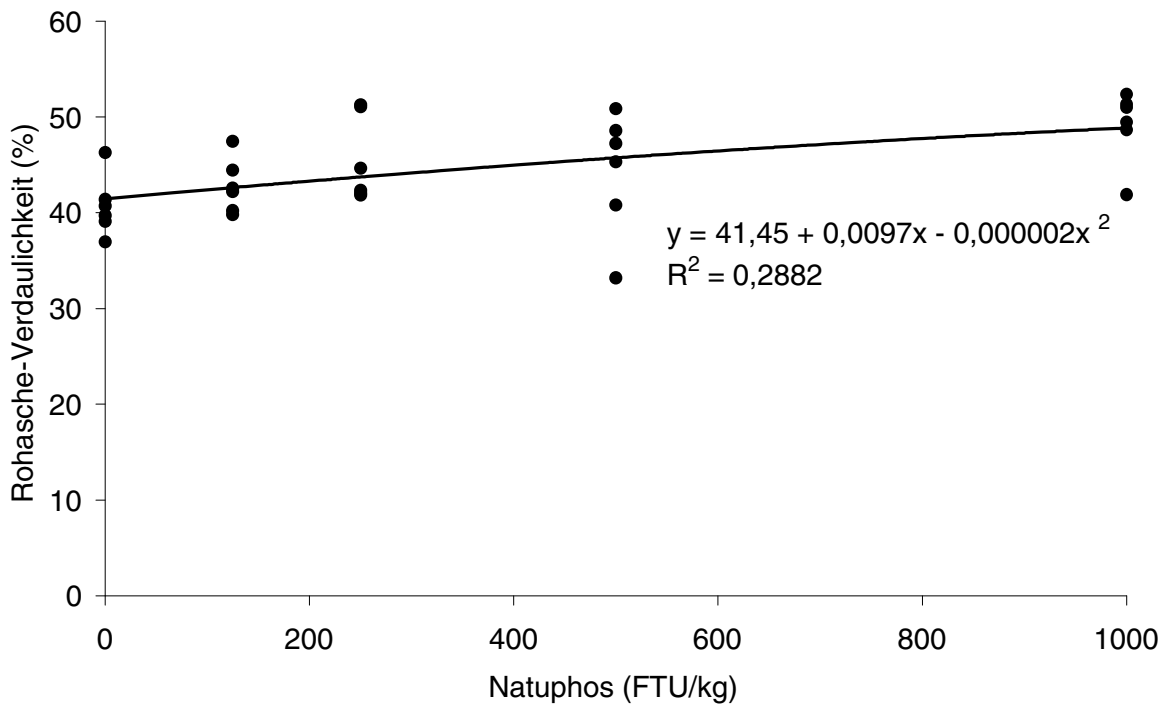


Abbildung 47: Effekt von Natuphos® auf die Ra-Verdaulichkeit (40. bis 45. Lebenstag)

# ERGEBNISSE

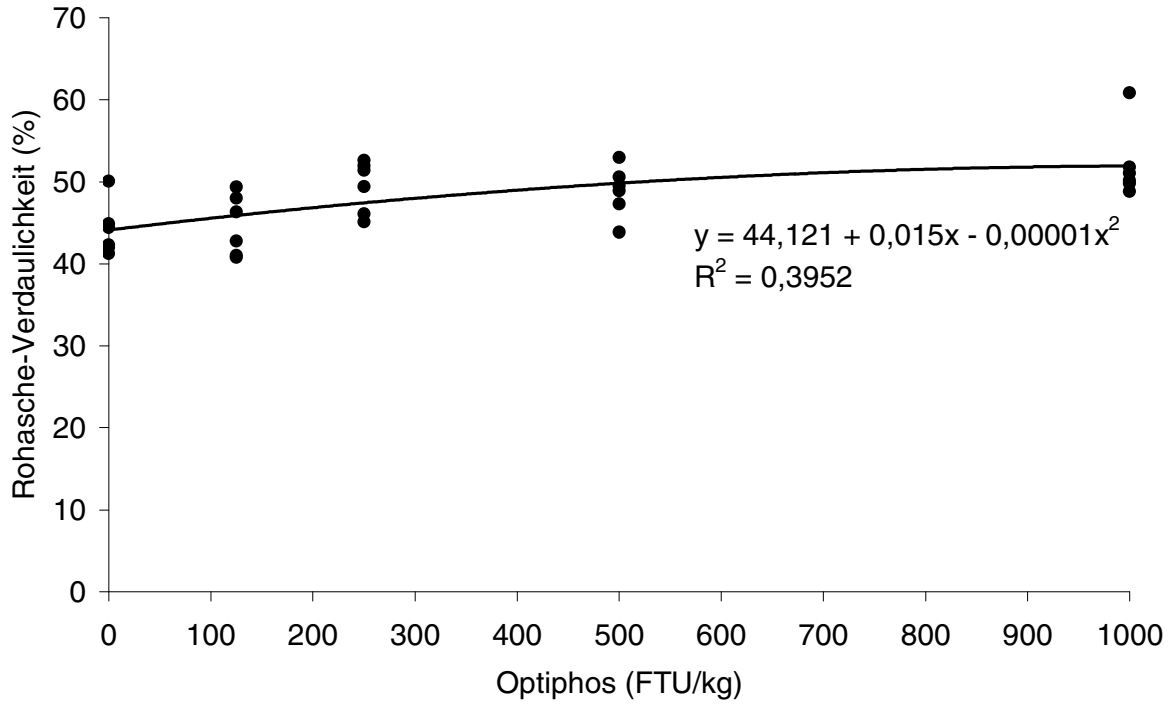


Abbildung 48: Effekt von Optiphos auf die Ra-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebenstag)

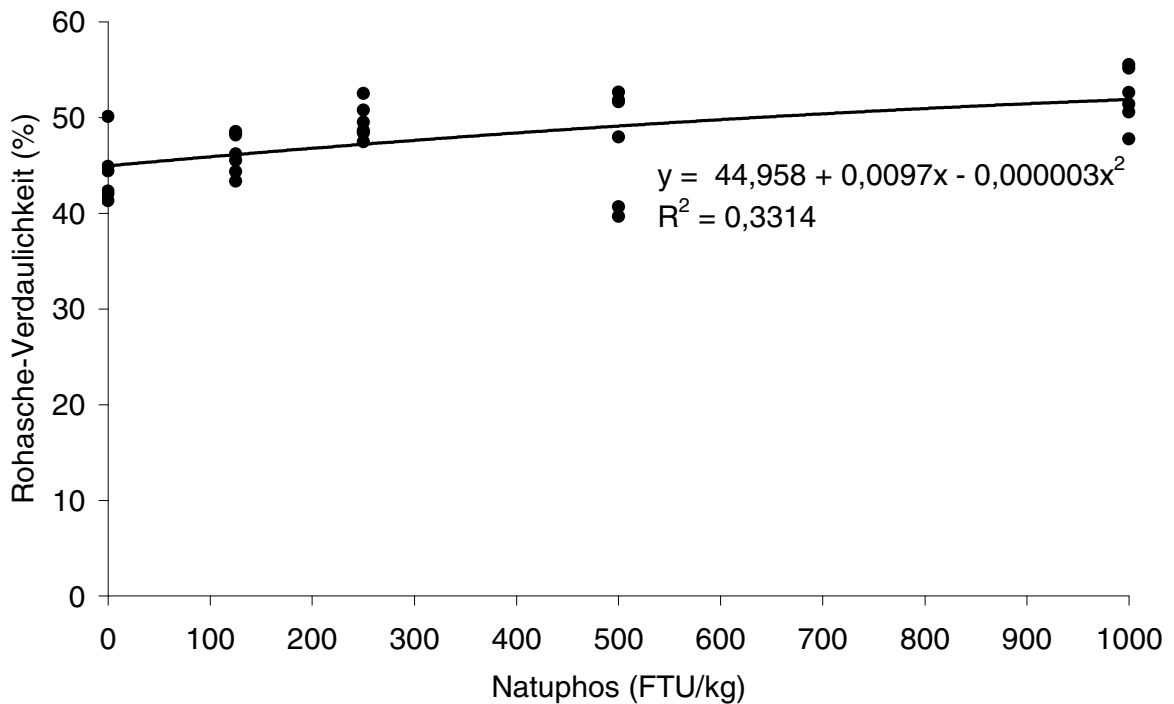


Abbildung 49: Effekt von Natuphos® auf die Ra-Verdaulichkeit (60. bis 65. Lebenstag)

## 5 Diskussion

### 5.1 Methoden zur Aktivitätsbestimmung in Phytase-Rohwaren

Um für die in dieser Studie untersuchten Phytasen die korrekte Aktivität zu ermitteln, wurde für die *E.coli*-Phytasen, Optiphos und FB-Phytase, die *Aspergillus*-Phytase Natuphos® und die *Peniophora*-Phytase ZY-Phytase die Methode nach Engelen et al. (1994) angewandt.

Die von den Herstellern dieser Enzyme deklarierten Phytaseaktivitäten sollten mittels dieser Untersuchung verifiziert werden.

Die Ergebnisse (Abschnitt 4.1) zeigen jedoch nahezu doppelt so hohe Enzymaktivitäten wie beim Hersteller angegeben. Die Ausnahme stellt in diesem Versuch die FB-Phytase dar. Sowohl bei der Pulverform als auch bei der granulierten Form dieses Enzyms ergeben sich mit der AOAC-Methode nach Engelen et al. zur Bestimmung der Phytaseaktivität niedrigere Aktivitäten als die deklarierten.

Obwohl die Methode nach Engelen et al. (Engelen et al., 1994) Grundlage der offiziellen Methoden zur Phytase-Aktivitätsbestimmung ist (angewandt von AOAC, Association of Official Agricultural Chemists und VDLUFA, Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), entwickeln die Hersteller von Phytasen eigene Methoden zur Aktivitätsbestimmung ihrer Produkte. Der Grund hierfür ist zum einen die schlechte Reproduzierbarkeit der mit der Methode nach Engelen et al. gewonnenen Ergebnisse beim Vergleich von Ergebnissen aus unterschiedlichen Laboratorien und zum anderen der aufwendige Analysengang.

Die meisten Hersteller vertreiben ihre Phytase-Produkte mit einer höheren Aktivität als deklariert und wenden auch als Methode zur Aktivitätsbestimmung eine Methode an, bei der die Aktivität unter der tatsächlich vorhandenen ausgewiesen wird. So wird eine hohe Wirksamkeit der Phytasepräparate bei – angeblich – niedriger Aktivität erreicht. Zudem wird auf diese Weise einem eventuell durch technologische Prozesse, Transport und Lagerung auftretenden Aktivitätsverlust entgegengewirkt.

Zum Vergleich der AOAC-Methode mit anderen Methoden zur Bestimmung der Phytaseaktivität wurde aus diesem Grund die Aktivität der granulierten Optiphos-Phytase zusätzlich mit der in Abschnitt 4.2 beschriebenen United Feeds-Methode untersucht und die FB-Phytase (Pulver und Granulat) wurde mit der Molybdat-Blau-Methode auf ihre Aktivität analysiert (siehe Abschnitt 4.3).

Bei Anwendung der United Feeds-Methode zum Vergleich mit der Engelen-Methode ist die analysierte Aktivität der Optiphos-Phytase zwar ebenfalls höher als die deklarierte Aktivität, jedoch liegt der Wert für das Optiphos-Granulat in diesem Fall nur um etwa 1500 FTU/g über dem des Herstellers.

Die für die FB-Phytase analysierte Aktivität liegt auch bei Anwendung dieser Methode unterhalb der deklarierten Aktivität, jedoch sind die Abweichungen auch hier geringer als bei der AOAC-Methode.

Es bestätigt sich also die Annahme, dass durch die von den Herstellern angewandte Methode eine niedrigere Phytaseaktivität ausgewiesen wird als durch die offizielle Methode.



## 5.2 Biochemische Charakterisierung der Phytasen

### 5.2.1 pH-Verhalten

Die in dieser Studie untersuchten Enzympräparate zeigen die pH-Optima der drei Phytasen Natuphos®, Optiphos und FB-Phytase im sauren Bereich an (pH 4,5 – 5,5). Ein pH-Optimum bei 4,5 wiesen auch Elkhail (2005) und Garrett et al. (2004) für eine *E.coli*-Phytase nach. Die FB-Phytase liegt mit einem Optimum bei pH 5,0 etwas höher. Die Ergebnisse für das pH-Optimum der *Aspergillus*-Phytase (pH-Wert = 5,5) stimmen mit den Angaben des Herstellers und Ergebnissen von Igbasan et al. (2000) und Elkhail (2005) überein.

Saure pH-Bedingungen finden sich im oberen Teil des Gastrointestinaltraktes monogastrischer Tiere, d.h. im Magen und im oberen Teil des Duodenums, im Bereich vor der Einmündung des Ductus pancreaticus. In dem Bereich des Duodenums nach der Einmündung des Ductus pancreaticus herrscht ein neutraler pH-Wert.

Da alle drei Phytasepräparate bei neutralem pH-Wert kaum bzw. keine Aktivität zeigen, ist die Wirksamkeit der Enzyme auf den Zeitraum der Passage durch den oberen Teil des Gastrointestinaltraktes begrenzt, wo die Konditionen für die Enzyme optimal sind.

### 5.2.2 Temperaturverhalten

#### 5.2.2.1 Temperaturoptimum

Die in dieser Studie gemessenen Temperaturoptima liegen mit Temperaturen von 50°C für Natuphos® und 55°C für die beiden *E.coli*-Enzyme (Optiphos und FB-Phytase) deutlich über den im Magen-Darm-Trakt der Tiere vorherrschenden Temperaturen von etwa 38°C - 42°C (je nach Nutztierart). Im Bereich von 40°C haben Optiphos und FB-Phytase 56% respektive 51% ihrer möglichen Aktivität und Natuphos® 78%. Das lässt darauf schließen, dass die beiden *E.coli*-Phytasen nur etwa die Hälfte und Natuphos® etwa Dreiviertel ihrer Aktivität im Körper des Wirtstieres entfalten.

Die in dieser Studie gemessenen Temperaturoptima befinden sich in Übereinstimmung mit den bei Elkhail (2005), Greiner et al. (1993) und Rodriguez et al. (Rodriguez et al., 1999) veröffentlichten Ergebnissen.

#### 5.2.2.2 Temperaturstabilität in wässriger Lösung

Eine weitere Eigenschaft, die für die Verwendung der Phytase als Futtermitteladditiv besonders wichtig ist, ist die Thermostabilität. Diese hat bei der Verarbeitung des Futters zu Pellets eine große Bedeutung. Die Temperaturstabilität der Enzyme ist zwar in wässrigen Lösungen wesentlich geringer als in trockenem Futter, dennoch werden Versuche zur Temperaturstabilität in wässrigen Lösungen im Labor durchaus genutzt, um mehrere Enzyme auf diese Art vergleichen zu können und so eine Art Ranking zu erhalten.

Die Temperaturstabilitätsmessungen in wässriger Lösung zeigen, dass Natuphos® von den drei getesteten Enzymen am stabilsten, Optiphos hingegen am wenigsten stabil ist.

Elkhalil (2005) konnte sehr ähnliche Ergebnisse für die Temperaturstabilität von Natuphos® in wässriger Lösung zeigen. Für die *E.coli*-Phytase konnte der Autor hingegen eine bessere Stabilität im wässrigen Medium aufzeigen, als es in dieser Studie der Fall ist.

### 5.2.2.3 Temperaturstabilität beim Pelletiervorgang

Phytasepräparate werden für gewöhnlich über ein Premix in eine Ration eingemischt, da die Konzentrationen mit 100-1000 mg/kg Futter relativ niedrig sind. Während der weiteren Verarbeitung zu Pellets wirken Temperaturen von 80°C oder mehr auf das Futter und somit auf die eingemischten Phytasen ein. Die Phytase kann lediglich mit der Restaktivität, die nach dem Pelletiervorgang noch verfügbar ist, im Gastrointestinaltrakt des Tieres wirken, sobald das Tier die mit Phytase supplementierten Pellets aufnimmt.

Beim Pelletieren wird das trockene Mischfutter mit heißem Dampf versetzt und mechanisch durch die Öffnungen einer Matrize gedrückt, wobei die Pellets ausgeformt werden.

Dieser Vorgang ist im Labor nicht nachstellbar. Aus diesem Grund wurde die Temperaturstabilität der Phytasepräparate zusätzlich zur Stabilitätsmessung im wässrigen Medium auch beim Pelletiervorgang geprüft.

Beim Pelletierversuch war das Vergleichsenzym zu den beiden *E.coli*-Phytasen nicht die *Aspergillus*-Phytase, sondern die ZY-Phytase (*Peniophora*).

Im Gegensatz zu den schlechten Ergebnissen für Optiphos bei der Temperaturstabilitätsmessung *in vitro* (wässriges Medium) schnitt diese *E.coli*-Phytase beim Pelletieren am besten ab. Auch bei hohen Temperaturen in der Matrize (85°C) wies das Enzym noch eine Restaktivität von 77% auf. Auch das Vergleichsenzym *Peniophora* hatte noch 96% Restaktivität bei dieser Temperaturstufe. Das zweite *E.coli*-Enzym (FB-Phytase) hingegen war nach dem Pelletieren bei 85°C inaktiv.

Die Ergebnisse, die in dieser Studie für die Temperaturstabilität beim Pelletieren gezeigt werden können, übertreffen die von Igbasan et al. (2000) beschriebenen Ergebnisse bei weitem.

Es ist auffällig, dass die beiden *E.coli*-Enzyme die Temperaturstabilität betreffend ein unterschiedliches Verhalten zeigen. Dafür könnte es mehrere Ursachen geben:

1. Die beiden Enzyme haben möglicherweise unterschiedliche Expressionssysteme. Das Expressionssystem von Optiphos ist *Pichia pastoris*, das Expressionssystem der FB-Phytase ist nicht bekannt.
2. Es kann zu unterschiedlichen Eigenschaften der Enzyme kommen, indem es zu gewollten oder unbeabsichtigten Punktmutationen und somit zum Austausch von Aminosäuren kommt. Ein Beispiel für auf diese Weise veränderte Enzymeigenschaften sind die in Abschnitt 2.3.5 beschriebenen gentechnisch veränderten Phytasen *Consensus* und *E.coli*-Phytase Phy9X.
3. Die Konfektionierung der untersuchten *E.coli*-Phytase-Präparate kann unterschiedlich sein. Beispielsweise kann das Granulat der beiden Enzympräparate sich in der Zusammensetzung grundlegend unterscheiden und es kann bei dem temperaturstabileren Enzym ein zusätzliches Coating auf das Granulat aufgebracht worden sein, welches das Enzym widerstandsfähiger macht.

### 5.2.3 Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen

#### 5.2.3.1 Stabilität gegenüber Pepsin und Pankreatin

Dieser *in-vitro*-Versuch wurde durchgeführt, um die Situation der Phytasen im Gastrointestinaltrakt des Tieres nachzustellen. Es sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß die natürlicherweise im Magen (Pepsin) respektive Duodenum (Pankreatin) sezernierten Enzyme auf die Phytaseaktivität einwirken.

Die pilzliche Phytase Natuphos® wurde durch beide proteolytischen Enzymaktivitäten in hohem Maße inaktiviert. Besonders für die Schädigung durch Pankreatin war die *Aspergillus*-Phytase empfänglich. Das *E.coli*-Enzym Optiphos hat durch die proteolytische Wirkung von Pepsin und Pankreatin fast die Hälfte der Enzymaktivität verloren und zeigte sich somit nur mittelmäßig widerstandsfähig. Die *E.coli*-Phytase FB-Phytase hat sich gegenüber Pepsin mit einer Restaktivität von 73,8% als geeignetste der drei Phytasen erwiesen, verlor jedoch bei Inkubation im Pankreatin-Medium stark an Aktivität.

Igbasan et al. (2000) und Elkhalil (2005) ermittelten für die Pepsin- und Pankreatinstabilität von *E.coli* deutlich bessere Werte, konnten jedoch bei *Aspergillus* ebenfalls keine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber den beiden Proteasen nachweisen.

Die Untersuchungen zeigen, dass die *E.coli*-Enzyme, vor allem die FB-Phytase gegenüber der *Aspergillus*-Phytase als Futterzusatzstoff im Bezug auf die Wirksamkeit im Verdauungstrakt überlegen sind.

Eine Minderung der Enzymaktivität durch die Verdauungsenzyme Pepsin und Pankreatin bedeutet für die als Futterzusatzstoff eingesetzten Phytasen, dass diese nicht mit ihrer vollen Aktivität, sondern eben nur mit einem Teil ihrer ursprünglichen Aktivität im Verdauungstrakt wirken können. Der Zeitfaktor spielt in diesem Zusammenhang ebenfalls eine große Rolle: Die Dauer der Magenpassage ist zwar vom Füllungszustand des Magens abhängig, jedoch ist davon auszugehen, dass eine Phytase, die als Hauptwirkungsort den Magen hat (wie die *Aspergillus*- und die *E.coli*-Phytase) nur etwa eine bis anderthalb Stunden wirken kann, bis die Digesta vom Magen in den Dünndarm abgegeben wird. Somit ist es für eine Phytase, die als Futterzusatzstoff eingesetzt wird und als Hauptwirkungsort den Magen hat (optimaler pH-Wert für diese Phytasen im sauren Bereich) von enormem Vorteil, wenn diese auch eine hohe Pepsinstabilität aufweist, um während der kurzen Verweildauer bestmöglich im Magen wirken zu können.

Das bedeutet für die in diesem Versuch getesteten Phytasen, dass die FB-Phytase im Magen einen deutlichen Vorteil gegenüber der *Aspergillus*-Phytase hat. Auch die *E.coli*-Phytase Optiphos kann noch mit etwa Dreiviertel der Aktivität im Magen wirken.

Im Dünndarm eignen sich sowohl die *Aspergillus*- als auch die *E.coli*-Phytase FB-Phytase wenig in Bezug auf den Phytatabbau. Beide Phytasen verlieren durch die Pankreatin-Einwirkung stark an Aktivität und haben zudem in dem im Dünndarm vorherrschenden neutralen pH-Bereich fast keine Restaktivität mehr (siehe Abschnitt 4.4.1). Bei dem *E.coli*-Enzym Optiphos verhält es sich ähnlich, was die Restaktivität im neutralen pH-Bereich angeht (siehe Abschnitt 4.4.1), jedoch ist die Widerstandsfähigkeit gegenüber Pankreatin mit etwa 50% Restaktivität etwas höher.

### 5.2.3.2 Effekt von Digestaüberstand auf die Phytaseaktivität

Der Effekt von Digestaüberstand auf die Phytaseaktivität wurde überprüft, um Anhaltspunkte dafür zu erhalten, wie stabil die unterschiedlichen Phytasen *in-vivo* in den unterschiedlichen Segmenten des Verdauungstraktes von Schweinen sind.

In der Digesta aus dem Magen des Schweines zeigen sich alle drei Phytasen stabil.

Der in der Magendigesta gemessene pH-Wert von 5,05 liegt sehr nahe bei den pH-Optima der Phytasen, für die FB-Phytase handelt es sich sogar um den optimalen pH-Wert (5,0). Diese Tatsache ist eine Erklärung dafür, dass die Enzyme in der Magendigesta stabil bleiben. Zudem war möglicherweise die Konzentration an Verdauungsenzymen in der Magendigesta nicht ausreichend hoch, um eine Minderung der Phytaseaktivität zu bewirken. Denn es ist in diesem Fall auch zu berücksichtigen, dass es bei der Aufbereitung der Digesta für die *in-vitro*-Versuche zu einer Verdünnung der Digesta kommt. Der ungewöhnlich hohe Magen-pH-Wert spricht für eine starke Abpufferung der Magensäure durch das im Magen befindliche Futter.

Im Bezug auf die Widerstandsfähigkeit in Jejunum-Digesta ist das *Aspergillus*-Enzym den beiden *E.coli*-Enzymen überlegen:

In der Jejunaldigesta hat Natuphos® noch knapp Dreiviertel der ursprünglichen Aktivität, die bakteriellen Phytasen Optiphos und FB-Phytase haben nur noch etwa ein Drittel ihrer ursprünglichen Aktivität.

Igbasan et al. (2000) zeigten eine gute Widerstandsfähigkeit der *E.coli*-Phytase in Magen- und Jejunaldigesta. Die Autoren untersuchten drei verschiedene *Aspergillus*-Phytasen und konnten unterschiedliche Ergebnisse für diese zeigen.

Die in *Aspergillus ficuum* exprimierte *Aspergillus*-Phytase, bei welcher es sich um das gleiche Enzym handelt, das auch in der hier vorliegenden Studie getestet wurde, hatte eine Restaktivität von ca. 60% in Magen- bzw. Jejunaldigesta. Die *Aspergillus*-Phytase bei Igbasan et al. ist im Jejunum stabiler als die in dieser Studie untersuchte *Aspergillus*-Phytase. In Magendigesta hat jedoch die in dieser Studie getestete Phytase besser abgeschnitten.

## 5.3 Produkte aus dem enzymatischen Abbau einer einzelnen Phytase

### 5.3.1 *Aspergillus*-Phytase (Natuphos®)

In Abschnitt 2.3.3.1, Abbildung 8 ist der von Skoglund et al. (1997) definierte Abbauweg dargestellt.

In dieser Arbeit konnte mittels der Methode von Schlemmer et al. (2001) ein sehr ähnlicher Weg des IP6-Abbaus gezeigt werden, wie in Abbildung 50 dargestellt.

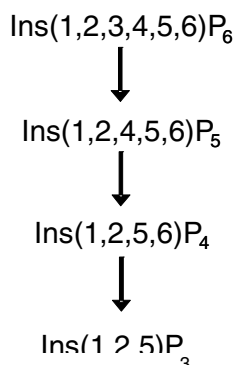


Abbildung 50: Abbauweg von Natuphos®

Nach 15 Minuten ist das erste Abbauprodukt, 1,2,4,5,6-IP5 entstanden, welches auch nach 45- und 90-minütiger Inkubation noch das Hauptabbauprodukt ist. IP4 und IP3 entstehen nach 45-minütiger Inkubation. Das Substrat wird während der gesamten Versuchsdauer von 120 Minuten nicht komplett abgebaut, der Substratabbau bei der *Aspergillus*-Phytase ist demnach nicht sehr effektiv. Für eine Phytase, deren Hauptwirkungsort der Magen ist, ist der Zeitfaktor und die Effektivität aber entscheidend, da zum einen die Retentionszeit im Magen und somit die Wirkdauer der Phytase begrenzt ist und zum anderen die Phytase proteolytisch inaktiviert wird.

Die Abbildung 19 verdeutlicht, wie langsam das Substrat abgebaut wird und wie wenig niedrigere Inositolphosphate in den ersten 45 Minuten gebildet werden.

Bei Skoglund et al. (1997) werden ab dem IP3 zwei alternative Abbauprodukte dargestellt. In dieser Studie konnte hingegen nur das 1,2,5-IP3 gezeigt werden und ein Abbau über das IP3 hinaus fand innerhalb der zweistündigen Inkubationsdauer nicht statt.

Skoglund et al. beschreiben, dass es sich bei der von ihnen angewandten Methode um eine besonders schnelle und empfindliche High Performance Ion Chromatography-Methode handelt. Die Auftrennung in die Abbauprodukte gelang den Autoren bereits nach 20 Minuten. Die in dieser Studie angewandte Methode kann demnach nicht direkt mit der bei Skoglund et al. beschriebenen Vorgehensweise verglichen werden.

### 5.3.2 *E.coli*-Phytase (Optiphos)

Der Abbau des Substrats durch die *E.coli*-Phytase Optiphos geht deutlich schneller als der Substratabbau durch Natuphos®. Bereits nach 15-minütiger Inkubation finden sich in der untersuchten Probe die Abbauprodukte IP5 und IP4. Nach 45 Minuten ist das Hauptabbauprodukt das 2,3,4,5-IP4 und nach 90 Minuten ist, im Gegensatz zum vergleichbaren Natuphos®-Chromatogramm, bereits kein Substrat und auch kein IP5 mehr im Chromatogramm erkennbar. Diese Phytase hat somit gegenüber der *Aspergillus*-Phytase einen deutlichen Vorteil, da sie schneller und effizienter das Substrat IP6 abbaut.

Diesen effizienten Substratabbau zeigt auch die Abbildung 24 deutlich. Im Vergleich zur *Aspergillus*-Phytase sind nach 45 Minuten deutlich mehr niedrigere Inositolphosphate entstanden und das Substrat wurde schon zum großen Teil abgebaut (vergleiche Abbildungen 19 und 24).

Der in dieser Studie gefundene Hauptabbaupfad für die *E.coli*-Phytase (Optiphos) ist in Abbildung 51 dargestellt.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Greiner et al. (2000) weitestgehend überein, jedoch konnte diese Arbeitsgruppe zudem die weiteren Abbauprodukte (IP2 und Monophosphat) der *E.coli*-Phytase zeigen.

Ein weiterer Unterschied zu den von der Arbeitsgruppe um Greiner gefundenen Ergebnissen ist die Tatsache, dass in dieser Untersuchung nach 45-minütiger Inkubation neben den Hauptabbauprodukten 1,2,3,4,5-IP5 und 2,3,4,5-IP4 auch geringe Mengen von 1,2,4,5,6-IP5 und 1,2,4,5-IP4 nachgewiesen werden konnten. Das deutet darauf hin, dass die neue *E.coli*-Phytase Optiphos zusätzlich zur 6-Phytase-Aktivität auch eine geringe 3-Phytase-Aktivität aufweist.

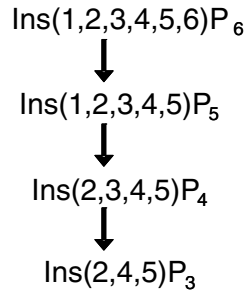


Abbildung 51: Abbauweg von Optiphos

### 5.3.3 *Bacillus*-Phytase

Bei der Analyse des Abbauweges der *Bacillus*-Phytase war es nicht möglich, das Abbauprodukt mit der Retentionszeit von 9,7 Minuten zu identifizieren. Es ist davon auszugehen, dass es sich entweder um ein weiteres IP4 handelt oder aber bereits um ein IP3. Dennoch kann diese Annahme nicht bewiesen werden.

Es hat sich klar gezeigt, dass das Enzym von *Bacillus amyloliquefaciens* von allen drei untersuchten Phytasen das Substrat Natriumphytat am langsamsten abgebaut hat. Nachweisbar waren nur die in Abbildung 52 aufgezeigten Abbauprodukte.

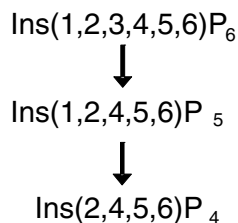


Abbildung 52: Abbauweg von *Bacillus amyloliquefaciens*

Während der gesamten Inkubationszeit war das IP5 das Hauptabbauprodukt. Das IP4 ist erstmals nach 45 Minuten in der Probe detektiert worden. Es muss allerdings erwähnt werden, dass im Zeitverlauf die Summe der detektierten Inositolphosphate auf molarer Basis nicht stabil bleibt (wie bei der *Aspergillus*- und der *E.coli*-Phytase), sondern dass diese Summe kleiner wird. Im Gegensatz dazu wird aber im Zeitverlauf der relative Flächenanteil des Peaks 1 (möglicherweise IP2, IP1 oder um freies Phosphat, siehe Abschnitt 4.6.3) immer größer. Das könnte durchaus dafür sprechen, dass die *Bacillus*-Phytase das Substrat doch weiter abbaut als nur bis zum IP4.

Der Abbauweg über das 1,2,4,5,6-IP5 und das 2,4,5,6-IP4 als Weg des Substratabbaus der *Bacillus*-Phytase wurde auch von Greiner et al. (2002a) und Kerovuo et al. (2000b) beschrieben.

Greiner et al. konnten für verschiedene *Bacillus*-Phytasen einen Abbauweg zeigen, der ab dem IP4 zwei unterschiedliche Verläufe nimmt (siehe Abschnitt 2.3.4.3).

Der Pfad über das 2,4,5,6-IP4 führte bei der Forschergruppe weiter bis zum Hauptendprodukt 2,4,6-IP3. Nur bei verlängerter Inkubation und mit einer erhöhten Enzymkonzentration gelang es, den weiteren Abbau der *Bacillus*-Phytase *in-vitro* bis hin zum Monophosphat zu zeigen (Greiner et al., 2002a).

#### 5.4 Produkte aus dem sequentiellen Phytatabbau durch eine *E.coli*- und eine *Bacillus*-Phytase

Der sequentielle Abbau der beiden Phytasen sollte zeigen, ob der Abbau der *E.coli*-Phytase (Hauptwirkungsort im Körper des Tieres ist der Magen) mit anschließendem Einsatz der *Bacillus*-Phytase (diese Phytase wirkt im Körper des Tieres hauptsächlich im Dünndarm) zu einem verbesserten Abbau des Substrates Natriumphytat führt und ob sich die beiden Enzyme synergistisch ergänzen können. Auch *in vivo* würden die beiden Phytasen im Verdauungstrakt des Tieres nacheinander wirken, da die Hauptwirkungsorte der beiden Enzyme aufgrund des pH-Verhaltens im Magen (*E.coli*) bzw. Dünndarm (*Bacillus*) liegen.

Eine weitere Fragestellung für diesen Versuch lautete, ob die *Bacillus*-Phytase in der Lage ist, ausser dem nach der Inkubation mit Optiphos verbliebenen IP6 auch die anderen Abbauprodukte des *E.coli*-Enzyms, also verschiedene niedrigere Inositolphosphate, zu nutzen.

In der Probe, die nach einstündiger Inkubation mit Optiphos untersucht wurde, fanden sich weitestgehend die gleichen Abbauprodukte wie in den Abschnitten 4.6.3.2 (45-minütige Inkubation) und 5.3.2 beschrieben. Auch in dieser Probe ließen sich neben den Hauptabbauprodukten die beiden Inositolphosphate 1,2,4,5,6-IP5 und 1,2,4,5-IP4 nachweisen.

Die Anteile an den unterschiedlichen Abbauprodukten haben sich im Vergleich zur 45-minütigen Inkubation mit Optiphos etwas verändert: Der Anteil an Inositolphosphaten mit weniger als fünf Phosphatgruppen sind zugunsten der kleineren Abbauprodukte wie IP4 und IP3 gesunken. Auch ist in der Probe nach 60 Minuten Inkubation mit Optiphos bereits ein Anteil von 15% des nicht identifizierten Abbauproduktes (siehe Abschnitt 4.6.3) zu finden.

Die in Abbildung 29 und Tabelle 32 dargestellten Abbauprodukte waren die Substrate für die *Bacillus*-Phytase.

Nachdem die *Bacillus*-Phytase 45 Minuten lang mit den Optiphos-Abbauprodukten inkubiert wurde, ist ein deutlicher Fortschritt im Substratabbau erkennbar: IP6 ist nicht mehr in der untersuchten Probe nachweisbar und die Anteile an IP4, IP3 und dem nicht identifizierten Abbauprodukt sind gestiegen. Zudem sind zwei neue Abbauprodukte in der Probe detektierbar, das 1,2,5,6-IP4 und das 2,4,5,6-IP4. Letzteres ist das im Hauptabbauweg der *Bacillus*-Phytase vorkommende myo-Inositol-tetrakisphosphat. Das 1,2,5,6-IP4 kommt zwar in dem in dieser Studie gefundenen Abbauweg der *Bacillus*-Phytase nicht vor, würde jedoch beweisen, dass das *Bacillus*-Enzym als Ausgangsprodukte auch andere Inositolphosphate nutzen kann.

Nach 90 Minuten hat die Phytase von *Bacillus amyloliquefaciens* das 1,2,4,5,6-IP5 komplett abgebaut, vom 1,2,3,4,5-IP5 hingegen konnten nur 2% abgebaut werden, so dass noch

immer 13,37% dieses Inositolphosphates in der Probe vorhanden sind. Der Anteil von 2,4,5-IP<sub>3</sub> ist sowohl nach 45 Minuten als auch nach 90 Minuten Inkubation deutlich gestiegen. Da kein weiteres IP<sub>3</sub> detektiert wurde, bedeutet das, dass die *Bacillus*-Phytase in dieser Studie nicht, wie bei Greiner und Kerovuo beschrieben, das 2,4,6-IP<sub>3</sub> als Endprodukt hat, sondern das Endprodukt der *E.coli*-Phytase anhäuft.

Die unterschiedlichen Substrate, also in diesem Fall die Abbauprodukte aus der Optiphos-Reaktion, haben die *Bacillus*-Phytase gezwungen, auf untypische Ausgangsprodukte für die enzymatische Spaltung zurückzugreifen.

Obwohl auch bei diesem Versuch kein IP<sub>2</sub> oder Monophosphat detektiert wurde, beweisen sowohl der Anstieg des IP<sub>3</sub> als auch des nicht identifizierten Abbauproduktes, dass die beiden Phytasen hier synergistisch wirken konnten und somit der Phytatabbau im Vergleich zur Wirkung einer einzelnen Phytase verbessert werden konnte.

Durch die Darstellung der relativen molaren Anteile der verschiedenen Inositolphosphate in Abbildung 32 wird ebenfalls deutlich, dass die *Bacillus*-Phytase trotz der untypischen Ausgangsprodukte (Abbauprodukte der *E.coli*-Phytase) effizient gearbeitet hat. Nach 90-minütiger Inkubation mit der *Bacillus*-Phytase ist der größte Anteil in der Probe mit mehr als 50% der Inositolphosphate das IP<sub>3</sub>. Das Substrat IP<sub>6</sub> ist bereits nach 45 Minuten Inkubation mit der *Bacillus*-Phytase abgebaut, IP<sub>5</sub> ist nur noch zu etwa 10% in der Probe enthalten.

## **5.5 *In-vivo*-Versuch: Effizienz einer *E.coli*- und einer *Aspergillus*-Phytase auf Gesundheit, Leistung und P- und Ca-Verdaulichkeit bei Absetzferkeln**

Der *in-vivo*-Versuch wurde durchgeführt, um die Effekte des kommerziellen Phytaseproduktes Natuphos®, welches als Futterzusatzstoff in der EU zugelassen ist, mit der *E.coli*-Phytase Optiphos im Hinblick auf Leistung, Phosphor-, Calcium- und Rohascheverdaulichkeit sowie im Hinblick auf die Freisetzung von Phosphor aus Phytat zu vergleichen.

### **5.5.1 Leistung**

#### **5.5.1.1 Gewichtszunahme**

Nach gestaffelter Zugabe der Optiphos-Phytase steigerte sich die Gewichtszunahme zwar dosisabhängig, war jedoch nur bei 1000 FTU/kg signifikant besser.

Bei entsprechend gestaffelter Zugabe von Natuphos®-Phytase zu den Diäten wurde die Gewichtszunahme bei Supplementierung von 250 FTU/kg und 1000 FTU/kg signifikant verbessert.

Der positive Effekt auf die Gewichtszunahme war sowohl bei Natuphos® als auch bei Optiphos am ausgeprägtesten während der dritten bis sechsten Woche des Experiments.

Beide Enzyme zeigten einen gleichermaßen positiven Einfluss auf die Gewichtszunahme bei Absetzferkeln. Ähnliche Beobachtungen in Bezug auf die Gewichtszunahme konnten auch Stahl und Mitarbeiter in einem Versuch mit einer *E.coli*-Phytase und Natuphos® machen (Stahl et al., 2000).



### 5.5.1.2 Futteraufnahme und Futteraufwand

Im Vergleich zur ungesupplementierten Diät konnte der Zusatz von 1000 FTU/kg von Optiphos und Natuphos® die Futteraufnahme signifikant erhöhen. Der Futteraufwand wurde durch beide Enzyme verbessert, jedoch war diese Verbesserung nicht signifikant.

Es wurden keine nennenswerten Unterschiede zwischen Optiphos und Natuphos® in Bezug auf Futteraufnahme und Futteraufwand beobachtet.

### 5.5.1.3 Scheinbare P-, Ca- und Rohasche-Verdaulichkeit

Im Vergleich zur Zugabe von Natuphos® verursachte die Supplementierung von Optiphos-Phytase in gestaffelten Mengen von 125 bis zu 1000 FTU/kg eine verbesserte P-Verdaulichkeit im Bereich von 125 bis 500 FTU/kg (bei Zugabe von 250 FTU/kg vom 60. – 65. Lebenstag signifikant verbessert). Bei Supplementierung von 1000 FTU/kg Optiphos war die P-Verdaulichkeit hingegen etwas schlechter als bei Natuphos®, wenn auch nicht signifikant.

Die Zugabe von 250 FTU/kg und 500 FTU/kg Optiphos konnte die Freisetzung des Phosphors aus Phytat im Vergleich zu Natuphos® verbessern (nicht signifikant). Bei Supplementierung von 1000 FTU/kg erhöhte hingegen Natuphos® die aus Phytat freigesetzte Menge an Phosphor (ebenfalls nicht signifikant).

In Abbildung 41 wird klar dargestellt, dass die *E.coli*-Phytase in niedrigeren Dosierungen einen größeren Einfluß auf die Phosphorverdaulichkeit der Absetzferkel hat, als die *Aspergillus*-Phytase. Diese *in-vivo*-Ergebnisse reflektieren die *in-vitro*-Ergebnisse der *E.coli*-Phytase den schnellen Phytatabbau betreffend.

Die Ergebnisse der Bestimmung des MCP-Äquivalents zeigen, dass bis zum Level von 500 FTU/kg Optiphos effizienter ist und im Gegensatz dazu Natuphos® bei einem Gehalt von 1000 FTU/kg überlegen ist.

Es kann der Schluss gezogen werden, dass das *E.coli*-Enzym ebenso effektiv war wie das kommerziell erhältliche Natuphos®. Bei Zugabe niedrigerer Mengen unterhalb von 1000 FTU/kg ist Optiphos bei der Verbesserung der P-Verdaulichkeit überlegen (das optimale Level ist die Zugabe von etwa 800 FTU/kg).

Auch in diversen anderen Versuchen mit jungen Schweinen konnte die Phosphorfreisetzung aus Phytat und somit die Verwertung des Phytatphosphors durch die Ferkel durch Zugabe einer *E.coli*-Phytase verbessert werden (Stahl et al., 2000; Augspurger et al., 2003; Adeola et al., 2004). Im Versuch von Augspurger und seinen Mitarbeitern zeigte die *E.coli*-Phytase sogar einen Vorteil gegenüber der kommerziellen Phytase (Natuphos®), bei Adeola et al. und Stahl et al. waren die beiden Enzyme wie im hier durchgeführten Versuch gleichermaßen effektiv.

## 5.6 Schlussfolgerungen

### 5.6.1 Schlussfolgerungen aus den *in-vitro*-Versuchen

Sowohl die neuen *E.coli*-Phytasen als auch das *Aspergillus*-Enzym weisen pH-Optima im sauren Bereich auf, was für eine überwiegende Wirkung im oberen Gastrointestinaltrakt spricht.

Die Temperaturoptima der untersuchten Enzyme liegen in Bereichen zwischen 50°C und 55°C. Somit konnte gezeigt werden, dass beide *E.coli*-Phytasen nur etwa die Hälfte und Natuphos® ca. Dreiviertel der bei der im Gastrointestinaltrakt vorherrschenden Körpertemperatur entfalten können.

Im Gegensatz zu den schlechten Ergebnissen für das *E.coli*-Enzym Optiphos bei der Temperaturstabilitätsmessung im wässrigen Medium war diese *E.coli*-Phytase in granulierter Form beim Pelletiersversuch am stabilsten. Auch das Vergleichsenzym *Peniophora* war unter diesen Bedingungen stabil. Die Pulverform der *E.coli*-Phytasen Optiphos und FB-Phytase sowie die FB-Phytase-Granula waren beim Pelletieren instabil. Dies lässt darauf schließen, dass die Konfektionierung der Optiphos-Phytase dieses Enzym besonders widerstandsfähig macht, die Konfektionierung der FB-Phytase hingegen keinen guten Schutz gegen die Hitzeeinwirkung beim Pelletieren bietet.

Bei Überprüfung der proteolytischen Stabilität war die Natuphos®-Phytase sowohl gegenüber proteolytischer Inaktivierung durch Pepsin- als auch durch Pankreatinlösung empfindlich, in Magen- und Jejunal Digesta vom Schwein hingegen zeigte sich das Enzym stabil. Optiphos zeigte sich in Pepsin- und Pankreatinlösung sowie in Jejunal Digesta kaum stabil, wies aber eine gute Stabilität in der Digesta des Magens auf.

Die FB-Phytase war die stabilste der drei getesteten Phytasen im Pepsinmedium und war ebenso in Magendigesta stabil. Bei Inkubation in Pankreatinlösung und in Jejunal Digesta war das Enzym jedoch nahezu instabil.

Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass sich die neuen *E.coli*-Enzyme FB-Phytase und Optiphos durchaus als Futterzusatzstoffe eignen würden. Die Wirksamkeit beider Phytasen beschränkt sich aber, aufgrund ihres pH-Verhaltens und aufgrund der Instabilität gegenüber den Verdauungsenzymen im unteren Gastrointestinaltrakt, auf den oberen Gastrointestinaltrakt.

Optiphos hat in Form des Granulats gegenüber der FB-Phytase den deutlichen Vorteil, hitzestabil beim Pelletiervorgang zu sein. Dies ist ein wichtiger Aspekt für den Einsatz als Futterzusatzstoff.

Die FB-Phytase könnte jedoch trotzdem in nicht pelletierten Rationen eingesetzt werden bzw. als Flüssigenzym auf Pellets aufgesprüht werden.

### 5.6.2 Schlussfolgerungen aus den Versuchen zum enzymatischen Abbau einzelner Phytasen und dem sequentiellen Phytatabbau durch eine *E.coli*- und eine *Bacillus*-Phytase

Die Abbauwege der einzelnen Phytasen *E.coli*, *Aspergillus* und *Bacillus* konnten in dieser Untersuchung dargestellt werden, und diese stimmen auch mit den bei anderen Autoren dargestellten Wegen überein (Skoglund et al., 1997; Greiner et al., 2000; Kerovuo et al., 2000b).

Es wurde deutlich, dass die Effizienz und Geschwindigkeit des Phytatabbaus der drei untersuchten Enzyme sehr unterschiedlich waren. Im Falle der *Bacillus amyloliquefaciens*-Phytase konnte als kleinstes Inositolphosphat nur das IP4 detektiert werden. Niedere Inositolphosphate wurden nicht nachgewiesen. Der Anstieg des unbekanntes Abbauproduktes (von dem nicht sicher gesagt werden kann, ob es sich um ein IP2, um IP1 oder um freies Phosphat handelt) gibt jedoch einen Hinweis darauf, dass möglicherweise auch in diesem Versuch ein weitergehender Substratabbau stattgefunden haben könnte. Die *Aspergillus*-Phytase konnte das Substrat IP6 zwar bis zum IP3 hinunter abbauen, jedoch fand dieser Abbau sehr langsam statt. Erst nach 45 Minuten Inkubation konnten die ersten IP3- und IP4-Abbauprodukte detektiert werden, jedoch war auch nach 90 Minuten noch immer das IP5 das Abbauprodukt mit dem größten Anteil an den gesamten Inositolphosphaten.

Die *E.coli*-Phytase war die einzige der drei untersuchten Enzyme, die das Substrat während der Gesamtinkubationsdauer komplett abgebaut hat. Der Abbau ging schnell vonstatten, bereits nach 90-minütiger Inkubation waren weder das Substrat noch IP5 in der Probe detektierbar.

Wenn man bedenkt, dass für die Phytasen als Futterzusatzstoff der Zeitfaktor limitierend ist, da die Digesta nur eine begrenzte Retentionszeit im Magen hat, hat die *E.coli*-Phytase von den drei untersuchten Phytasen in dieser Hinsicht also das beste Potential.

Beim Phytatabbau durch kombinierten, sequentiellen Einsatz der *E.coli*- und *Bacillus*-Phytasen konnten deutliche Verbesserungen im Phytatabbau gezeigt werden: beide Phytasen konnten in diesem Versuch synergistisch arbeiten und somit den Phytatabbau im Vergleich zur Wirkung einer einzelnen Phytase optimieren. Die *Bacillus*-Phytase käme auch bei einem kombinierten Einsatz der beiden Phytasen *in vivo* erst nach der *E.coli*-Phytase zum Einsatz, da der Hauptwirkungsort dieser Phytase der Dünndarm und nicht, wie bei der *E.coli*-Phytase, der Magen ist. Das *Bacillus*-Enzym hatte nach der Inkubation von *E.coli* mit dem Substrat IP6 demnach als Substrate die *E.coli*-Abbauprodukte zur Verfügung. Obwohl auch noch IP6 als Substrat verfügbar war, musste die *Bacillus*-Phytase vor allem von für sie ungewöhnlichen Abbauprodukten die Phosphatreste abspalten. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Abbau tatsächlich stattgefunden hat und nach 90-minütiger Inkubation mit der *Bacillus*-Phytase über die Hälfte der Abbauprodukte IP3 war.

Dieser Versuch weist darauf hin, dass es sinnvoll ist, bei zukünftigen Forschungsvorhaben weitere Versuche zur Verbesserung des Phytatabbaus mit Kombination von *E.coli*- und *Bacillus*-Phytasen durchzuführen.

Die Problematik bei der hier angewandten Methode zur Bestimmung der Abbauprodukte bestand darin, dass einzelne Inositolphosphate nicht eindeutig bestimmt werden konnten,

weil die entsprechenden Standards nicht verfügbar waren. Für weitergehende Studien wäre es wünschenswert, dass die detektierten Abbauprodukte sicherer zugeordnet werden könnten. Der Abbau des Substrates durch die Phytasen konnte in dieser Studie mit Sicherheit zwar nur bis zum IP3 bzw. IP4 gezeigt werden, jedoch weist die Vermehrung des nicht näher identifizierten Abbauproduktes (IP2, IP1 oder freies Phosphat) darauf hin, dass wohl doch ein weitergehender Abbau stattgefunden hat. Bei Versuchen anderer Autoren konnten auch die niederen Inositolphosphate beim Phytatabbau gezeigt werden (Skoglund et al., 1997; Greiner et al., 2000; Kerovuo et al., 2000b). Das kann ein Hinweis darauf sein, dass deren HPLC-Systeme und die Methoden zur Untersuchung des Phytatabbaus ggf. sensibler sind als die in dieser Studie verwendeten Geräte und Methoden.

### **5.6.3 Schlussfolgerungen aus dem *in-vivo*-Versuch mit Absetzferkeln**

Das *E.coli*-Enzym Optiphos war im Fütterungsversuch im Hinblick auf Leistung und scheinbare Verdaulichkeit ebenso effektiv wie das kommerziell erhältliche Natuphos®.

Diese Tatsache unterstreicht die Schlussfolgerungen aus den *in-vitro*-Versuchen, dass die Optiphos-Phytase sich als Futterzusatzstoff gut eignet.

Für die zukünftige Forschung wäre es anzuraten, auch in Fütterungsversuchen zu untersuchen, ob mit einer Kombination von *E.coli*- und *Bacillus*-Phytase eine noch effektivere Leistungssteigerung und Verbesserung der scheinbaren Verdaulichkeit zu erzielen ist.

## 6 Zusammenfassung

**Paula Brünig**

### ***In-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen zur Effizienz verschiedener mikrobieller Phytasen als Futterzusatzstoff**

Zwei *E.coli*-Phytasen (Optiphos und FB-Phytase) wurden hinsichtlich ihrer biochemischen Fähigkeiten untersucht (pH-Verhalten, Temperaturverhalten und –stabilität sowie proteolytische Stabilität), um deren Eignung als Futterzusatzstoff zu überprüfen. Als Vergleichsenzym wurde die kommerziell erhältliche *Aspergillus*-Phytase Natuphos® hinzugezogen.

Die Ergebnisse zum pH-Verhalten zeigen, dass die pH-Optima der untersuchten Enzyme im sauren Bereich liegen. Die *E.coli*-Phytasen weisen ihre pH-Optima bei 4,5 und 5,0 auf, während Natuphos® die optimale Wirkung bei pH 5,5 zeigt. Im neutralen pH-Bereich sind alle Enzyme inaktiv.

Das Temperaturoptimum der Phytasen wurde ermittelt, indem die Enzyme bei acht unterschiedlichen Temperaturen zwischen 30°C und 80°C in Natriumacetatpuffer mit dem für das jeweilige Enzym optimalen pH-Wert für 60 Minuten inkubiert wurden. Die anschließenden Aktivitätsbestimmungen zeigten, dass die Temperaturoptima für beide *E.coli*-Enzyme bei 55°C und für die *Aspergillus*-Phytase bei 50°C liegen.

Die Temperaturstabilität der Phytasen wurde für drei unterschiedliche Temperaturen und jeweils für eine Gesamtdauer von 120 Minuten bestimmt. Die Enzyme wurden in Natriumacetatpuffer mit dem jeweils optimalen pH-Wert inkubiert und anschließend die Phytaseaktivität gemessen. Die Temperaturstabilitätsmessungen in wässriger Lösung zeigen, dass Natuphos® von den drei getesteten Enzymen am stabilsten, Optiphos hingegen am wenigsten stabil ist. Schon bei 20-minütiger Inkubation bei 50°C weist die Optiphos-Phytase unter 10% Restaktivität auf, FB-Phytase und Natuphos® hingegen noch 60% respektive 80% Restaktivität.

Die Phytasen wurden ferner hinsichtlich ihrer Hitzestabilität beim Pelletiervorgang untersucht. Hierbei wurde als Vergleichsenzym die *Peniophora*-Phytase ZY-Phytase hinzugezogen. Die zu einem Mischfutter für Broiler supplementierten Phytasen wurden beim Pelletieren vier unterschiedlichen Temperaturen zwischen 55°C und 85°C ausgesetzt. Das *E.coli*-Enzym Optiphos (in der granulierten Form) war die stabilere der beiden *E.coli*-Phytasen. Bei 85°C wies dieses Enzym eine Restaktivität von 77% auf. Auch das Vergleichsenzym *Peniophora* war unter diesen Bedingungen stabil (96% Restaktivität bei 85°C). Die FB-Phytase war sowohl in granulierter Formulierung als auch in Pulverform bei 85°C inaktiv, aber auch die Pulverform des Optiphos-Enzyms war bei 85°C nicht stabil.

Um die Widerstandsfähigkeit der Phytasen gegenüber Proteasen zu testen, wurden die Enzympräparate für 20 Minuten in wässriger Pepsin- bzw. Pankreatinlösung bei 40°C inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass das Vergleichsenzym Natuphos® empfindlich gegenüber Pepsin, besonders aber gegenüber Pankreatin ist. Optiphos verlor in beiden Medien etwa 45% der Aktivität und ist somit nur mäßig stabil gegenüber proteolytischer

Inaktivierung. FB-Phytase ist relativ unempfindlich gegenüber Inaktivierung durch Pepsin (etwa 74% Restaktivität), jedoch empfindlich gegenüber Pankreatin.

Auch wurde der Einfluss von Digestaüberstand auf die Enzyme untersucht. Die Inkubationen erfolgten bei 40°C für 60 Minuten in der Digestalösung aus dem Magen und proximalem Jejunum vom Schwein. In der Magendigesta mit einem pH-Wert von 5,05 waren sowohl die *Aspergillus*-Phytase als auch die *E.coli*-Phytasen stabil. In der Jejunaligesta (pH-Wert 6,34) waren die *E.coli*-Phytasen Optiphos und FB-Phytase mit Restaktivitäten von 35% und 38% eher instabil, Natuphos® zeigte hingegen mit 70% Restaktivität eine akzeptable Stabilität.

Der Weg und die Effizienz des Substratabbaus der *Aspergillus*-, *E.coli*- und *Bacillus*-Phytasen wurden durch Inositolphosphatbestimmung mittels HPLC untersucht.

Für jedes der zu prüfenden Enzyme wurde eine Enzymlösung hergestellt und diese mit Substratlösung (Natriumphytat) für unterschiedliche Zeiten (15, 45, 90 und 120 Minuten) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion der Phytase gestoppt und die Inositolphosphatbestimmung mittels HPLC durchgeführt.

Es konnte für die *Aspergillus*-Phytase ein Hauptabbauweg des Substrates über das 1,2,4,5,6-IP5 und das 1,2,5,6-IP4 bis zum 1,2,5-IP3 gefunden werden. Für das *E.coli*-Enzym Optiphos wurde mittels HPLC ein Weg des Substratabbaus vom IP6 zum 1,2,3,4,5-IP5 und dann über das 2,3,4,5-IP4 zum 2,4,5-IP3 gefunden. Der Abbauweg der *Bacillus amyloliquefacens*-Phytase konnte wie folgt dargestellt werden: IP6, 1,2,4,5,6-IP5, 2,4,5,6-IP4. Die *E.coli*-Phytase war von den drei untersuchten Enzymen am schnellsten und am effizientesten beim Substratabbau: schon nach 90 Minuten war das Substrat komplett abgebaut und auch das Abbauprodukt IP5 war nicht mehr vorhanden. Weder die *Aspergillus*- noch die *Bacillus*-Phytase konnten IP6 komplett abbauen, zudem fand der Substratabbau deutlich langsamer statt als bei der *E.coli*-Phytase.

Um die Möglichkeit einer Synergie zwischen der Optiphos- und der *Bacillus*-Phytase hinsichtlich des Phytatabbaus zu prüfen, wurden diese beiden Enzyme nacheinander zum Phytatabbau eingesetzt und das Ergebnis anschließend durch die Bestimmung der Inositolphosphate im HPLC untersucht. Zunächst wurde das Enzym Optiphos für 60 Minuten mit Natriumphytat inkubiert, anschließend die Reaktion gestoppt und dieselbe Probe mit dem *Bacillus*-Enzym nochmals für 45 respektive 90 Minuten inkubiert.

Beim Abbau des Substrates konnten durch kombinierten Einsatz der *E.coli*- und *Bacillus*-Phytase deutliche Verbesserungen gezeigt werden: Beide Phytasen agierten in diesem Versuch synergistisch und konnten somit den Phytatabbau im Vergleich zur Wirkung einer einzelnen Phytase optimieren.

Die *in-vivo*-Studie wurde konzipiert, um den dosisabhängigen Effekt von Optiphos in den hauptsächlich aus Mais und Optigrain bestehenden Diäten für Ferkel zu bestimmen. Die Diäten hatten eine marginale Ca- und P-Versorgung und wurden während der sechswöchigen Fütterungsperiode (24.-65. Lebenstag der Ferkel) ohne oder mit Phytasesupplementierung zu der Basaldiät mit den Enzymen Optiphos (bakterieller Ursprung aus *E.coli*) und Natuphos® (pilzlicher Ursprung aus *Aspergillus niger*) in Dosierungen von 125, 250, 500 und 1000 FTU/kg Futter verabreicht. Das Fütterungsexperiment hatte zum Ziel, die Effizienz der bakteriellen *E.coli*-Phytase in abgestuften Konzentrationen auf

verschiedene Leistungsparameter im Vergleich zur pilzlichen Phytase oder der Negativkontrolle ohne Enzymsupplementierung einschätzen zu können. Die untersuchten Leistungsparameter waren Wachstum, Gewichtszunahme, Futteraufwand, Kotkonsistenz sowie die scheinbare Verdaulichkeit mit Fokus auf Kalzium, Phosphor und Rohasche.

Das *E.coli*-Enzym Optiphos war im Fütterungsversuch im Hinblick auf Leistung und scheinbare Verdaulichkeit ebenso effektiv wie das kommerziell erhältliche Natuphos®. Der positive Effekt auf die Gewichtszunahme war sowohl bei Natuphos® als auch bei Optiphos am ausgeprägtesten während der dritten bis sechsten Woche des Experiments. Beide Enzyme zeigten einen gleichermaßen positiven Einfluss auf die Gewichtszunahme bei Absatzferkeln.

Im Vergleich zur un-supplementierten Diät konnte der Zusatz von 1000 FTU/kg von Optiphos und Natuphos® die Futteraufnahme signifikant erhöhen.

Die Ergebnisse der Bestimmung des MCP-Äquivalents zeigen, dass bis zum Level von 500 FTU/kg Optiphos effizienter ist und im Gegensatz dazu Natuphos® bei einem Gehalt von 1000 FTU/kg überlegen ist.

Bei Zugabe niedrigerer Mengen unterhalb von 1000 FTU/kg ist Optiphos bei der Verbesserung der P-Verdaulichkeit überlegen (das optimale Level ist die Zugabe von 800 FTU/kg).

## 7 Summary

**Paula Brünig**

### ***In-vitro* and *in-vivo* studies on the efficacy of various microbial phytases as feed additives**

Two *E.coli* phytases (Optiphos and FB-Phytase) were examined regarding their biochemical abilities (pH behaviour, temperature behaviour and –stability as well as proteolytic stability) to validate their suitability as feed additives. The commercially available *Aspergillus* phytase Natuphos® has been consulted as the comparing enzyme.

The results of the pH behaviour show that the pH optimum of the examined enzymes is located in the acidic range. The optimal pH values of the *E.coli* phytases are 4.5 and 5.0, whereas Natuphos® shows the best effect at pH 5.5. In the neutral pH range all enzymes are inactive.

The temperature optimum for the phytases was determined by incubating the enzymes in a sodium acetate buffer with the optimal pH value for each of the enzymes at eight different temperatures in the range of 30°C to 80°C for 60 minutes. The subsequent determination of the phytase activity showed a temperature optimum at 55°C for both *E.coli* phytases and an optimal temperature of 50°C for the *Aspergillus* enzyme.

The temperature stability of the phytases was determined for three different temperatures and with a total period of 120 minutes. The enzymes were incubated in sodium acetate buffer with the optimal pH value for each of the enzymes. Afterwards the phytase activity was determined. The measurements of temperature stability in aqueous solution show that Natuphos® is the most stable of the three examined enzymes, whereas Optiphos is the least stable one. After 20 minutes of incubation at 50°C Optiphos already has a residual phytase activity of less than 10%, however FB-Phytase and Natuphos® exhibit residual activities of 60% and 80% respectively.

The phytases were also examined regarding their heat stability during the pelleting process. In this case the *Peniophora* phytase ZY-Phytase was consulted as the comparing enzyme. The phytases were added to a mixed ration for pigs which was exposed to four different temperatures between 55°C and 85°C while pelletizing. The *E.coli* enzyme Optiphos (in the granulated form) was the more stable *E.coli* phytase. At 85°C this enzyme had a residual activity of 77%. The comparing enzyme *Peniophora* was also stable under these conditions (96% residual activity at 85°C). The FB-Phytase was inactivated at 85°C both in the granulated form and as powder. The powder form of the Optiphos enzyme was also not stable at 85°C.

To assay the resistance of the phytases against proteases the enzyme preparations were incubated in an aqueous pepsin- or pancreatin solution at 40°C. The results show that the comparing enzyme Natuphos® is sensitive to pepsin but even more sensitive to pancreatin. Optiphos lost about 45% of its activity in both media and is therefore only moderately resistant to proteolytic inactivation. FB-Phytase is relatively insensitive towards the pepsin inactivation (about 74% residual activity).



The influence of digesta supernatant on the enzymes has been tested as well. The incubations were carried out at 40°C for 60 minutes in a digesta solution from the stomach and proximal jejunum of a pig. In the digesta of the stomach with a pH value of 5.05 the *Aspergillus* phytase as well as the *E.coli* phytases were stable. The *E.coli* phytases Optiphos and FB-Phytase were instable in the digesta of the jejunum (pH value 6.34) and showed residual activities of 35% and 38% respectively. Natuphos® showed a reasonable stability with 70% residual activity.

The pathway as well as the efficiency of dephosphorylation of the *Aspergillus*-, the *E.coli*- and the *Bacillus* phytases were assayed by determining the inositolphosphates using HPLC. For every analysed enzyme an enzyme solution was prepared and then incubated at 37°C with a substrate solution (sodium phytate) for different periods (15, 45, 90 and 120 minutes). Subsequently the phytase reaction was stopped and the determination of the inositolphosphates by use of HPLC was conducted.

For the *Aspergillus* phytase a main pathway of the substrate dephosphorylation has been found, which leads to the 1,2,5-IP<sub>3</sub> via 1,2,4,5,6-IP<sub>5</sub> and 1,2,5,6-IP<sub>4</sub>. The pathway for the *E.coli* enzyme Optiphos leads from the IP<sub>6</sub> via 1,2,4,5,6-IP<sub>5</sub> and 2,3,4,5-IP<sub>4</sub> to the 2,4,5-IP<sub>3</sub>. The pathway of dephosphorylation of the *Bacillus amyloliquefaciens* phytase can be constituted as follows: IP<sub>6</sub>, 1,2,4,5,6-IP<sub>5</sub>, 2,4,5,6-IP<sub>4</sub>. The *E.coli* phytase was the fastest and most efficient enzyme for substrate degradation of the three assayed enzymes: after 90 minutes the substrate was already completely degraded and the degradation product IP<sub>5</sub> was also inexistent. Neither the *Aspergillus* phytase nor the *Bacillus* phytase were able to degrade the IP<sub>6</sub> completely, moreover the substrate degradation proceeded obviously more slowly than in case of the *E.coli* phytase.

To verify the possibility of a synergy of the Optiphos- and the *Bacillus* phytase concerning the phytate degradation, the two enzymes were applied successively for phytate degradation. The result was analysed via determination of inositolphosphates using HPLC. At first the Optiphos enzyme was incubated with sodium phytate for 60 minutes, then the reaction was stopped and the same sample was incubated with the *Bacillus* enzyme for 45 or 90 minutes respectively.

By combined application of both the *E.coli*- and the *Bacillus* phytase notable improvements in substrate degradation could be demonstrated: Both phytases acted out synergetically in this trial and were therefore able to optimise phytate degradation in comparison to the effect of a single phytase.

The *in vivo* study was conducted to determine the dose dependent effect of Optiphos in the diets for piglets containing mainly corn and Optigrain. The diets had a marginal Ca- and P supply and were fed to the piglets with or without phytase supplementation with the enzymes Optiphos (bacterial origin from *E.coli*) and Natuphos® (fungal origin from *Aspergillus niger*) during a six-week feeding period (24th to 65th days of life) in dosages of 125, 250, 500 and 1000 FTU/kg. The study aimed to assess the efficacy of the bacterial phytase at graded levels in comparison to the fungal phytase or the negative control without enzyme supplementation on performance parameters. The determined performance parameters were

## S U M M A R Y

---

growth, weight gain or feed efficiency, faecal consistency and apparent digestibility with focus on calcium, phosphorus and crude ash.

In the feeding trial the *E.coli* enzyme Optiphos was as effective as the commercial Natuphos® regarding the performance and apparent digestibility. The most positive effect on weight gain was observed during the 3rd to 6th week of the experiment. Both enzymes showed an equally positive influence on weight gain in weaning piglets.

In comparison to the unsupplemented diet the supplementation of 1000 FTU/kg of both Optiphos and Natuphos® is able to increase the feed intake significantly.

The results from the determination of the MCP equivalent show that up to a level of 500 FTU/kg Optiphos was more efficient. In contrast to this Natuphos® is superior at a level of 1000 FTU/kg.

With addition of levels below 1000 FTU/kg Optiphos is superior in the improvement of phosphorus digestibility (the optimal level is the addition of 800 FTU/kg).

**8 Zitierte Literatur**

Adeola, O.; Sands, J. S.; Simmins, P. H.; Schulze, H. (2004):  
The efficacy of an *Escherichia coli*-derived phytase preparation.  
*J Anim Sci* 82, 2657-2666.

al-Asheh, S.; Duvnjak, Z. (1995):  
The effect of phosphate concentration on phytase production and the reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid-state fermentation process.  
*Appl Microbiol Biotechnol* 43, 25-30.

Anderson, P. A. (1985):  
Interactions between proteins and constituents that affect quality.  
In: *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds.* / J. W. Finley, and D. T. Hopkins (Hrsg.). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota. 31-54.

Anderson, R. J. (1914):  
A contribution to the chemistry of phytin.  
*J Biol Chem* 17, 171-190.

Asada, K.; Tanaka, K.; Kasai, Z. (1969):  
Formation of phytic acid in cereal grains.  
*Ann N Y Acad Sci* 165, 801-814.

Augspurger, N. I.; Webel, D. M.; Lei, X. G.; Baker, D. H. (2003):  
Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs.  
*J Anim Sci* 81, 474-483.

Barré, R.; Courtois, J. E.; Wormser, G. (1954):  
Étude de la structure de l'acide phytique au moyen de ses courbes de titration et de la conductivité de ses solutions.  
*Bull Soc Chim Biol* 36, 455-474.

Berridge, M. J.; Irvine, R. F. (1989):  
Inositol phosphates and cell signalling.  
*Nature* 341, 197-205.

Biswas, S.; Maity, I. B.; Chakrabarti, S.; Biswas, B. B. (1978):  
Purification and characterization of myo-inositol hexaphosphate-adenosine diphosphate phosphotransferase from *Phaseolus aureus*.  
*Arch Biochem Biophys* 185, 557-566.

Campbell, G. L.; Bedford, M. R. (1992):  
Enzyme applications for monogastric feeds: A review.  
*Can J Anim Sci* 72, 449-466.

Chang, C. W. (1967):  
Study of phytase and flouride effects in germinating corn seeds.  
Cereal Chem 44, 129-142.

Cheryan, M. (1980):  
Phytic acid interactions in food systems.  
Crit Rev Food Sci Nutr 13, 297-335.

Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals Board on Agriculture and Natural Resources Division on Earth and Life Studies (2005):  
Phosphorus.  
In: Mineral Tolerance of Animals (2nd rev.ed.). / N. R. C. o. t. N. Academies (Hrsg.).  
Washington, D.C.: The National Academies Press, 500 Fifth Street, N.W., Washington, DC 20001. ISBN: 0-309-09654-5,  
290-299.

Cooper, J. R.; Gowing, H. S. (1983):  
Mammalian small intestinal phytase (EC 3.1.3.8).  
Br J Nutr 50, 673-638.

Cromwell, G. L.; Coffey, R. D.; Parker, G. R.; Monegue, H. J.; Randolph, J. H. (1995):  
Efficacy of a recombinant-derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs.  
J Anim Sci 73, 2000-2008.

De Angelis, M.; Gallo, G.; Corbo, M. R.; McSweeney, P. L.; Faccia, M.; Giovine, M.; Gobbetti, M. (2003):  
Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1.  
Int J Food Microbiol 87, 259-270.

De Stefano, C.; Milea, D.; Pettignano, A.; Sammartano, S. (2003):  
Speciation of phytate ion in aqueous solution. Alkali metal complex formation in different ionic media.  
Anal Bioanal Chem 376, 1030-1040.

Deshpande, S. S.; Cheryan, M. (1984):  
Effect of phytic acid, divalent cations, and their interactions on alpha- amylase activity.  
J Food Sci 49, 516-524.

Dvorakova, J. (1998):  
Phytase: sources, preparation and exploitation.  
Folia Microbiol (Praha) 43, 323-338.

Eeckhout, W.; De Paepe, M. (1994):  
Total phosphorus, phytate- phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs.  
Anim Feed Sci Technol 47, 19-29.

Elkhalil, E. A. I. (2005):

In vitro and In vivo Characteristics of Bacterial Phytases and Their Applications in Broiler Chickens and Laying Hens.  
Berlin, Humboldt-Universität. Dissertation, 144.

Elkhalil, E. A. I.; Männer, K.; Borriss, R.; Simon, O. (2004):

Studies on Efficacy of Bacterial Phytases in Broiler Chicken.

In: 8. Tagung Schweine- und Geflügelernährung.

Wittenberg, Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Halle- Wittenberg. - ISBN: 3-86010-742-9. 16-18.

Elkhalil, E. A. I.; Männer, K.; Borriss, R.; Simon, O. (2007):

In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens.  
Br Poult Sci 48, 64-70.

Engelen, A. J.; van der Heeft, F. C.; Randsdorp, P. H.; Smit, E. L. (1994):

Simple and rapid determination of phytase activity.

J AOAC Int 77, 760-764.

Erdman, J. W., Jr. (1979):

Oilseed Phytates: Nutritional Implications.

J Am Oil Chem Soc 56, 736-741.

Erdman, J. W., Jr.; Poneros-Schneier, A. (1989):

Phytic acid interactions with divalent cations in foods and in the gastrointestinal tract.

Adv Exp Med Biol 249, 161-171.

Garrett, J. B.; Kretz, K. A.; O'Donoghue, E.; Kerovuo, J.; Kim, W.; Barton, N. R.; Hazlewood, G. P.; Short, J. M.; Robertson, D. E.; Gray, K. A. (2004):

Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as a phosphate-mobilizing monogastric-feed supplement.

Appl Environ Microbiol 70, 3041-3046.

Gentile, J. M.; Roneker, K. R.; Crowe, S. E.; Pond, W. G.; Lei, X. G. (2003):

Effectiveness of an experimental consensus phytase in improving dietary phytate-phosphorus utilization by weanling pigs.

J Anim Sci 81, 2751-2757.

GfE (1999):

Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler).

60489 Frankfurt am Main. ISBN: 3-7690-0577-5.

GfE (2006):

Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen.

D-60489 Frankfurt am Main: DLG Verlag. ISBN: 3-7690-0683-6.

- Gibbins, L. N.; Norris, F. W. (1963):  
Phytase and acid phosphatase in the dwarf bean, *Phaseolus vulgaris*.  
*Biochem J* 86, 67-71.
- Gibson, D. M.; Ullah, A. H. (1988):  
Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds.  
*Arch Biochem Biophys* 260, 503-513.
- Graf, E.; Empson, K. L.; Eaton, J. W. (1987):  
Phytic acid. A natural antioxidant.  
*J Biol Chem* 262, 11647-11650.
- Greiner, R.; Carlsson, N.; Alming, M. L. (2000):  
Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*.  
*J Biotechnol* 84, 53-62.
- Greiner, R.; Farouk, A.; Alming, M. L.; Carlsson, N. G. (2002a):  
The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp.  
*Can J Microbiol* 48, 986-994.
- Greiner, R.; Haller, E.; Konietzny, U.; Jany, K. D. (1997):  
Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*.  
*Arch Biochem Biophys* 341, 201-206.
- Greiner, R.; Konietzny, U.; Jany, K. D. (1993):  
Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*.  
*Arch Biochem Biophys* 303, 107-113.
- Greiner, R.; Konietzny, U.; Jany, K. D. (1998):  
Purification and properties of a phytase from rye.  
*J Food Biochem* 22, 143-161.
- Greiner, R.; Larsson Alming, M.; Carlsson, N. G.; Muzquiz, M.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Pedrosa, M. M.; Goyoaga, C. (2002b):  
Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds.  
*J Agric Food Chem* 50, 6865-6870.
- Ha, N. C.; Kim, Y. O.; Oh, T. K.; Oh, B. H. (1999):  
Preliminary X-ray crystallographic analysis of a novel phytase from a *Bacillus amyloliquefaciens* strain.  
*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 691-693.

Igbasan, F. A.; Männer, K.; Miksch, G.; Borriss, R.; Farouk, A.; Simon, O. (2000):  
Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins.  
Arch Tierernähr 53, 353-373.

Inagawa, J.; Kiyosawa, I.; Nagasawa, T. (1987):  
Effect of phytic acid on the hydrolysis of lactose with beta- galactosidase.  
Agric Biol Chem 51, 3027-3032.

Ingelmann, H.-J.; Rimbach, G.; Pallauf, J. (1993):  
Phytinsäure- ein antinutritiver Faktor?  
Ernährungsumschau 40, 400-404.

Jackl, G. A.; Rambeck, W. A.; Kollmer, W. E. (1985):  
Retention of cadmium in organs of the rat after single dose of labeled cadmium-3-phytate.  
Biol Trace Elem Res 7, 69-74.

Jeroch, H.; Drochner, W.; Simon, O. (1999):  
Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere.  
Stuttgart.ISBN: 3-8252-8180-9.

Jongbloed, A. W.; Kemme, P. A. (2002):  
Phosphor-Versorgung von Schweinen ohne Futtermittel tierischer Herkunft.  
Lohmann Information 1.

Kerovuo, J.; Lappalainen, I.; Reinikainen, T. (2000a):  
The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase.  
Biochem Biophys Res Commun 268, 365-369.

Kerovuo, J.; Lauraeus, M.; Nurminen, P.; Kalkkinen, N.; Apajalahti, J. (1998):  
Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from  
*Bacillus subtilis*.  
Appl Environ Microbiol 64, 2079-2085.

Kerovuo, J.; Rouvinen, J.; Hatzack, F. (2000b):  
Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a  
novel reaction mechanism.  
Biochem J 352 Pt 3, 623-628.

Kerovuo, J.; Tynkkynen, S. (2000):  
Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755.  
Lett Appl Microbiol 30, 325-329.

Kim, D. H.; Oh, B. C.; Choi, W. C.; Lee, J. K.; Oh, T. K. (1999):  
Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive.  
Biotechnol Lett 21, 925-927.

- Kim, Y. O.; Kim, H. K.; Bae, K. S.; Yu, J. H.; Oh, T. K. (1998):  
Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11.  
Enzyme Microb Technol 22, 2-7.
- Kleist, S. (2002):  
Optimierung eines fermentativen Verfahrens zur Herstellung einer bakteriellen Phytase.  
Bielefeld, Universität Bielefeld. 173.
- Kornegay, E. T. (2001):  
Digestion of Phosphorus and Other Nutrients: the Role of Phytases and Factors Influencing  
Their Activity.  
In: Enzymes in farm animal nutrition. / M. R. Bedford, and G. G. Partridge (Hrsg.).  
Marlborough, Wiltshire, UK: CAB International. 237-271.
- Laboure, A. M.; Gagnon, J.; Lescure, A. M. (1993a):  
Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate  
phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination.  
Biochem J 295, 413-419.
- Laboure, A. M.; Gagnon, J.; Lescure, A. M. (1993b):  
Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate  
phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination.  
Biochem J 295 ( Pt 2), 413-9.
- Lassen, S. F.; Breinholt, J.; Ostergaard, P. R.; Brugger, R.; Bischoff, A.; Wyss, M.; Fuglsang,  
C. C. (2001):  
Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four  
basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes*  
*pubescens*.  
Appl Environ Microbiol 67, 4701-4707.
- Lehmann, M.; Loch, C.; Middendorf, A.; Studer, D.; Lassen, S. F.; Pasamontes, L.; van Loon,  
A. P.; Wyss, M. (2002):  
The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept.  
Protein Eng 15, 403-411.
- Lehmann, M.; Pasamontes, L.; Lassen, S. F.; Wyss, M. (2000):  
The consensus concept for thermostability engineering of proteins.  
Biochim Biophys Acta 1543, 408-415.
- Lolas, G. M.; Markakis, P. (1977):  
The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*).  
J Food Sci 42, 1094-1106.
- Low, M. G.; Saltiel, A. R. (1988):  
Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes.  
Science 239, 268-275.



- Mandal, N. C.; Biswas, B. B. (1970):  
Metabolism of inositol phosphates. I. Phytase synthesis during germination in cotyledons of mung beans (*Phaseolus aureus*).  
Plant Physiol 20, 4-7.
- Männer, K.; Simon, O. (2006):  
Effectiveness of microbial phytases in diets of sows during gestation and lactation.  
J Anim Feed Sciences 15, 199-211.
- Mihailovic, M. L.; Antic, M.; Hadzije, D. (1965):  
Chemical investigation of wheat. VIII. Dynamics of various forms of phosphorus in wheat during its ontogenesis. The extent and mechanism of phytic acid decomposition in germinating wheat grain.  
Plant Soil 23, 117-128.
- Mitchell, D. B.; Vogel, K.; Weimann, B. J.; Pasamontes, L.; van Loon, A. P. (1997):  
The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*.  
Microbiology 143, 245-252.
- Nagai, Y.; Funahashi, S. (1962):  
Phytase from wheat bran. Part I. Purification and substrate specificity.  
Agric Biol Chem 26, 794-803.
- Nakano, T.; Joh, T.; Narita, K.; Hayakawa, T. (2000):  
The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases from wheat bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin #61.  
Biosci Biotechnol Biochem 64, 995-1003.
- Naumann, C.; Bassler, R. (1976):  
VDLUFA Methodenbuch Band III  
Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.  
Darmstadt: VDLUFA-Verlag, Darmstadt. ISBN: 3-922712-66-7.
- Oh, B. C.; Choi, W. C.; Park, S.; Kim, Y. O.; Oh, T. K. (2004):  
Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases.  
Appl Microbiol Biotechnol 63, 362-372.
- O'Halloran, T. V. (1993):  
Transition metals in control of gene expression.  
Science 261, 715-725.
- Pallauf, J.; Rimbach, G. (1997):  
Nutritional significance of phytic acid and phytase.  
Arch Tierernahr 50, 301-319.

- Peers, F. G. (1953):  
The phytase of wheat.  
Biochem J 53, 102-110.
- Reddy, N. R.; Sathe, S. K.; Salunkhe, D. K. (1982):  
Phytates in legumes and cereals.  
Adv Food Res 28, 1-92.
- Rimbach, G.; Pallauf, J. (1998):  
Phytic acid inhibits free radical formation in vitro but does not affect liver oxidant or antioxidant status in growing rats.  
J Nutr 128, 1950-1955.
- Rodehutschord, M. (2001):  
Der gegenwärtige Stand der Phosphorbewertung für Nutztiere.  
Lohmann Information 1, 1-9.
- Rodehutschord, M. (2008):  
Can we further improve the efficiency of utilisation of phosphorus?  
In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology.  
Göttingen, Germany, DLG-Verlag. - ISBN: 978-3-7690-4101-9. Band 17, 179-183.
- Rodehutschord, M.; Faust, M.; Lorenz, H. (1996):  
Digestibility of phosphorus contained in soybean meal, barley, and different varieties of wheat, without and with supplemental phytase fed to pigs and additivity of digestibility in a wheat-soybean-meal diet.  
J Anim Physiol Anim Nutr 75, 40-48.
- Rodriguez, E.; Han, Y.; Lei, X. G. (1999):  
Cloning, sequencing, and expression of an Escherichia coli acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon.  
Biochem Biophys Res Commun 257, 117-123.
- Sajidan, A.; Farouk, A.; Greiner, R.; Jungblut, P.; Muller, E. C.; Borriss, R. (2004):  
Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium Klebsiella sp. ASR1.  
Appl Microbiol Biotechnol 65, 110-118.
- Sandberg, A. S. (2002):  
Bioavailability of minerals in legumes.  
Br J Nutr 88, 281-285.
- Sandberg, A. S.; Brune, M.; Carlsson, N. G.; Hallberg, L.; Skoglund, E.; Rossander-Hulthen, L. (1999):  
Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans.  
Am J Clin Nutr 70, 240-246.

- Schlemmer, U.; Jany, K. D.; Berk, A.; Schulz, E.; Rechkemmer, G. (2001):  
Degradation of phytate in the gut of pigs--pathway of gastro-intestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved.  
Arch Tierernähr 55, 255-280.
- Selle, P. H.; Ravindran, V.; Caldwell, R. A.; Bryden, W. L. (2000):  
Phytate and phytase: consequences for protein utilisation.  
Nutrition Research Reviews 13, 255-278.
- Simon, O.; Flachowsky, G. (2006):  
Futterzusatzstoffe in der Tierernährung.  
In: Futtermittelzusatzstoffe- Technologie und Anwendung. / H.-C. Pape (Hrsg.).  
Bergen/Dumme: Agrimedia GmbH. ISBN: 3-86037-261-0,  
19-32.
- Simon, O.; Igbasan, F. A. (2002):  
In vitro properties of phytases from various microbial origins.  
Int J Food Sci Technol 37, 813-822.
- Singh, B.; Sedeh, H. G. (1979):  
Characteristics of Phytase and its relationship to acid phosphatases and certain minerals in triticale.  
Cereal Chem 56, 267-272.
- Singh, M.; Krikorian, A. D. (1982):  
Inhibition of Trypsin activity in vitro by phytate.  
J Agric Food Chem 30, 799-800.
- Skoglund, E.; Carlsson, N.-G.; Sandberg, A.-S. (1997):  
Analysis of Inositol Mono- and Diphosphate Isomers Using High- Performance Ion Chromatography and Pulsed Amperometric Detection.  
J Agric Food Chem 45, 4668-4673.
- Spring, W. (2006):  
Enzyme.  
In: Futtermittelzusatzstoffe- Technologie und Anwendung. / H.-C. Pape (Hrsg.).  
Bergen/Dumme: Agrimedia GmbH. ISBN: 3-86037-261-0,  
271-283.
- Stahl, C. H.; Roneker, K. R.; Thornton, J. R.; Lei, X. G. (2000):  
A new phytase expressed in yeast effectively improves the bioavailability of phytate phosphorus to weanling pigs.  
J Anim Sci 78, 668-674.
- Taussky, H. H.; Shorr, E. (1953):  
A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus.  
J Biol Chem 202, 675-685.

Tiller, H. (2000):

Ist der Einsatz von Enzymen in der Legehennenernährung sinnvoll?

Lohmann Information 3, 1-5.

Tseng, Y. H.; Fang, T. J.; Tseng, S. M. (2000):

Isolation and characterization of a novel phytase from *Penicillium simplicissimum*.

Folia Microbiol (Praha) 45, 121-127.

Vincent, J. B.; Crowder, M. W.; Averill, B. A. (1992):

Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions.

Trends Biochem Sci 17, 105-110.

Volfova, O.; Dvorakova, J.; Hanzlikova, A.; Jandera, A. (1994):

Phytase from *Aspergillus niger*.

Folia Microbiol (Praha) 39, 481-484.

Williams, P. J.; Taylor, T. G. (1985):

A comparative study of phytate hydrolysis in the gastrointestinal tract of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the laboratory rat.

Br J Nutr 54, 429-435.

Wise, A.; Gilbert, D. J. (1981):

Binding of cadmium and lead to the calcium-phytate complex in vitro.

Toxicol Lett 9, 45-50.

Wodzinski, R. J.; Ullah, A. H. (1996):

Phytase.

Adv Appl Microbiol 42, 263-302.

Wyss, M.; Brugger, R.; Kronenberger, A.; Remy, R.; Fimbel, R.; Oesterheld, G.; Lehmann, M.; van Loon, A. P. (1999):

Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties.

Appl Environ Microbiol 65, 367-373.

Yang, G. Y.; Shamsuddin, A. M. (1995):

IP6-induced growth inhibition and differentiation of HT-29 human colon cancer cells: involvement of intracellular inositol phosphates.

Anticancer Res 15, 2479-2487.

Yanke, L. J.; Bae, H. D.; Selinger, L. B.; Cheng, K. J. (1998):

Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria.

Microbiology 144, 1565-1573.

Zamudio, M.; Gonzalez, A.; Medina, J. A. (2001):

*Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase.

Lett Appl Microbiol 32, 181-184.

Tabelle 41: Mikrobielle Phytasen und ihre Eigenschaften

Phytase (Herkunft des Gens) 3-/6-Phytase	Molekulargewicht (kDA)	pH-Optimum	Inaktiv bei pH	Temperatur-Optimum (°C)	Temperaturstabilität	Proteolytische Stabilität	Endprodukt des Phytatabbaus	Produktionsorganismus	Bemerkung	Lit.
Aspergillus A ( <i>Aspergillus ficuum</i> ) 3-Phytase		5,5	7,5	50	P 60°C:92,6%* P 70°C:70,5% P 80°C:30,9%	60'(40°C): 25,9%Pe 22,6%Pa <sup>+</sup> K:98,5% <sup>1</sup> M:60,4% <sup>2</sup> D:93,6% <sup>3</sup> J:60,2% <sup>4</sup> I: 54,5% <sup>5</sup>		<i>Aspergillus niger</i>		(Igbasan et al., 2000)
Aspergillus R ( <i>Aspergillus ficuum</i> ) 3-Phytase		5,5	7,5	50	P 60°C:84,0% P 70°C:62,3% P 80°C:19,8%	60'(40°C): 32,2%Pe 26,7%Pa K:97,4% M:67,8% D:96,4% J:90,0% I:81,3%		<i>Brassica napus</i>		(Igbasan et al., 2000)
Aspergillus T ( <i>Aspergillus awamori</i> ) 3-Phytase		5,0	7,5	50	P 60°C:51,9% P 70°C:25,0% P 80°C:6,5%	60'(40°C): 8,1%Pe 0%Pa K:92,6% M:56,8% D:90,3% J:42,9% I:56,4%		<i>Trichoderma reesei</i>		(Igbasan et al., 2000)
Peniophora ( <i>Peniophora lycii</i> ) 6-Phytase		4,5	<2,0 7,0	50	P 60°C:74,5%# P 70°C:66,2% P 80°C:57,0%	60'(40°C): 1,8%Pe 0%Pa K:96,8% M:59,2% D:94,8% J:91,1% I:84,8%		<i>Aspergillus oryzae</i>		(Igbasan et al., 2000)

\*) P 60°C: 92,6%=Nach Pelletiervorgang bei 60°C (Temperatur gemessen im Konditionierer) 92,6% Restaktivität

#) P 60°C:74,5%= Nach Pelletiervorgang bei 60°C (Temperatur gemessen im Konditionierer) 92,6% Restaktivität, bei pH5,5 gemessen (vom Hersteller empfohlener pH &) Inkubation für die Temperaturstabilitätsmessung wurde in wässrigen Lösungen vorgenommen (sofern keine anderen Angaben vorhanden)

+ ) 60'(40°C):25,9%Pe,22,6%Pa= Nach 60 min. Inkubation bei 40°C in wässriger Pepsin.(Pe) - bzw. Pankreatin (Pa)- Lösung 25,9% bzw. 22,6% Restaktivität des Enzyms  
1-5) K:98,5%=restliche Phytaseaktivität in % nach 60 min Inkubation bei 40°C in Lösung aus Digestatüberstand aus dem Inhalt aus Kropf (K), Magen (M), Duodenum (D), Jejunum (J) und Ileum (I) von Hühnern

Tabelle 41: Fortsetzung

Phytase (Herkunft des Gens) 3-/6-Phytase	Molekulargewicht (kDA)	pH-Optimum	Inaktiv bei pH	Temperatur-Optimum (°C)	Temperaturstabilität	Proteolytische Stabilität	Endprodukt des Phytat-abbaus	Produktionsorganismus	Bemerkung	Lit.
Peniophora ( <i>Peniophora lycii</i> ) 6-Phytase		4,0-4,5		50-55	Restaktivität nach 1 Std. Inkubation bei pH 5,5 und 80°C: 62%		Ins(2)P	<i>Aspergillus oryzae</i>		(Lassen et al., 2001)
Penicillium ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ) 3-Phytase	65	4,0	>7,5	55	Starker Aktivitätsverlust bei >60°C; bei 80°C noch 30% Aktivität				Durch Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> und Zn <sup>2+</sup> gehemmt; Isoelektrischer Punkt: pH 5,8	(Tseng et al., 2000)
Klebsiella terrigena ( <i>Klebsiella terrigena</i> ) 3-Phytase	40	5,0	>7,5	58	Aktivitätsverlust bei >55°C, starker Verlust bei 60°C			<i>Klebsiella terrigena</i>	Zyto-plasmatisches, monomeres Enzym; potenteste Inhibitoren: Cu, Zn, F, P, Molybdat, Vanadat	(Greiner et al., 1997)
Klebsiella ASR1 ( <i>Klebsiella sp.</i> ASR1) 3-Phytase	42	5,0	<4,0 >7,0	45-50	Aktivitätsverlust ab >55°C (15min Inkub.) Bei 60°C (15 min) inaktiv	60'(40°C): 86,7%Pe 94,8%Pa M:96,8% D:96,3%	Ins(2)P	<i>E.coli</i> C41		(Sajidan et al., 2004), (Eikhalil et al., 2004)

Tabelle 41: Fortsetzung

Phytase (Herkunft des Gens) 3-/6-Phytase	Molekulargewicht (kDA)	pH-Optimum	Inaktiv bei pH	Temperatur-Optimum (°C)	Temperaturstabilität	Proteolytische Stabilität	Endprodukt des Phytat- abbaus	Produktionsorganismus	Bemerkung	Lit.
<i>E.coli</i> ( <i>E.coli</i> ) 6-Phytase		4,5	7,0	60	P60°C:98,8% P70°C:78,0% P80°C:24,4%	60'(40°C): 94,6%Pe 95,9%Pa K:96,9% M:92,8% D:96,8% J:86,7% I:80,8%		<i>E.coli</i>		(Igbasan et al., 2000)
<i>E.coli</i> AppA ( <i>E.coli</i> AppA saure Phosphatase- Gen) 6-Phytase	46,3	2,5		55				<i>Pichia pastoris</i>		(Rodriguez et al., 1999)
<i>E.coli</i> AppA2 ( <i>E.coli</i> AppA2 saure Phosphatase- Gen) 6-Phytase	46,3	2,5-3,5		55	Bei 65-80°C Aktivität größtenteils verloren			<i>Pichia pastoris</i>		(Rodriguez et al., 1999)
<i>E.coli</i> P2 ( <i>E.coli</i> ) 6-Phytase	42	4,5	>7,0 <3,0	55	Starker Akt.- Verlust bei >60°C; keine Akt. bei 70°C		Ins(2)P	<i>E.coli</i>	Peri- plasma- tisches Enzym	(Greiner et al., 1993), (Greiner et al., 2000)

Tabelle 41: Fortsetzung

Phytase (Herkunft des Gens) 3-/6-Phytase	Molekulargewicht (kDA)	pH-Optimum	Inaktiv bei pH	Temperatur-Optimum (°C)	Temperaturstabilität	Proteolytische Stabilität	Endprodukt des Phytat- abbaus	Produktionsorganismus	Bemerkung	Lit.
Bacillus ( <i>Bacillus subtilis</i> ) 3-Phytase		7,0	>9,0 <5,0	60	20min,60°C: stabil;60min,70° C:30% Restakt. 120min, 70°C: 20% Restakt	60'(40°C): 19,3%Pe 91,1%Pa K:93,5% M:70,8% D:95,3% J:91,5% I:97,3%		<i>Bacillus subtilis</i>	Ca <sup>2+</sup> - abhängiges Enzym	(Igbasan et al., 2000) (Simon und Igbasan, 2002)
Bacillus PhyC (PhyC von <i>Bacillus subtilis</i> VTT E68013) 3-Phytase	43	7,0	>8,5 <4,0	55				<i>E.coli</i>	Isoelektr. Punkt: 6,5; Ca <sup>2+</sup> -abhängig	(Kerovo et al., 1998)
Bacillus PhyC (PhyC von <i>Bacillus subtilis</i> VTT E68013) 3- und 6-Phytase							Zwei Abbauewege: Ins(2,4,6)P <sub>3</sub> ; Ins(1,3,5)P <sub>3</sub>	<i>Bacillus subtilis</i> BD170	Ca <sup>2+</sup> - abhängiges Enzym; keine Hemmung der Enzymakt. durch Vanadat, F <sub>i</sub> , myo- Inositol-sulfat; keine Produkt- hemmung	(Kerovo et al., 2000b)
Bacillus DS11 ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )	44	7,0	<4,0 >8,0	70	Ohne CaCl <sub>2</sub> : 10min.>50°C: instabil Mit CaCl <sub>2</sub> : 10min.,90°C: 50%Restakt. P80°C:t <sub>1/2</sub> =42mi			<i>Bacillus subtilis</i> DB104	Temperatur- stabilität abhängig von CaCl <sub>2</sub>	(Kim et al., 1998) (Kim et al., 1999)



Tabelle 41: Fortsetzung

Phytase (Herkunft des Gens) 3-/6-Phytase	Molekular- gewicht (kDA)	pH- Optimum	Inaktiv bei pH	Temperatur- Optimum (°C)	Temperatur- stabilität	Proteolytische Stabilität	Endprodukt des Phytat- abbaus	Produktions- organismus	Bemerkung	Lit.
Lactobacillus ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )	52	5,5	2,5-3,5 6,5	65	Instabil ab >70°C			<i>Lactobacillus plantarum</i>		(Zamudio et al., 2001)
Consensus (synthetisches Gen)		4,5-5,5	7,0 2,0	71	P60°C:110,5 % P70°C:101,0 % P80°C:100,0 %	60'(40°C): 85,3%Pe 95,8%Pa K:91,5% M:86,5% D:88,3% J:78,0% I:85,8%		<i>Hansenula polymorpha</i>		(Simon und Igbasan, 2002)
Consensus 1 (synthetisches Gen von 13 pilzlichen Phytasen)				71	Temperatur, bei der das Enzym denaturiert und sich entfaltet: 78°C; Katalytische Aktivität bei 37°C nicht gefährdet					(Lehmann et al., 2000)

Tabelle 41: Fortsetzung

Phytase (Herkunft des Gens) 3-/6-Phytase	Molekulargewicht (kDA)	pH-Optimum	Inaktiv bei pH	Temperatur-Optimum (°C)	Temperaturstabilität	Proteolytische Stabilität	Endprodukt des Phytat-abbaus	Produktionsorganismus	Bemerkung	Lit.
Consensus (synthetisches Gen von 13 pilzlichen Phytasen)		6,5		71						(Gentile et al., 2003)
Consensus 10 (synthetisches Gen von 13 pilzlichen Phytasen)				80	Temperatur, bei der das Enzym denaturiert und sich entfaltet: 85,4°C					(Lehmann et al., 2002)
Phy9X (AppA von <i>E.coli</i> )		4,5	<2,5		1h bei 62°C: stabil 10 min bei 85°C: 27% Verlust der Aktivität	3,5fache Steigerung der Stabilität des Enzyms im Magen gegenüber Eltermenzym (in $t^{1/2}$ ausgedrückt)				(Garrett et al., 2004)

## DANKSAGUNG

---

Mein besonderer Dank gilt...

- ... Herrn Prof. Dr. Ortwin Simon für die Überlassung des Dissertationsthemas, und die zuvorkommende persönliche Unterstützung und fachliche Betreuung.
- ... Herrn Prof. Dr. Klaus Männer für die Unterstützung und Hilfe, vor allem bei den Fütterungsversuchen.
- ... Herrn Dr. Klaus Schäfer für die Einführung in die Durchführung und Technik diverser Analyseverfahren und für seine Hilfsbereitschaft.
- ... der Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven für die finanzielle Unterstützung meiner Untersuchungen und Herrn Dr. Mathias Schurz für die hilfreichen fachlichen Gespräche und Anregungen.
- ... Herrn Prof. Dr. Rainer Borriss, der mir die *Bacillus*-Phytase für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat und sich bereit erklärt hat, diese Arbeit zu begutachten.
- ... Herrn Prof. Dr. Georg W. Mayr und Frau Dr. Hongying Lin vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für Ihre freundliche Unterstützung bei den HPLC-Analysen.
- ... Frau Felicitas Antonelli für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse.
- ... Susan und Petra für ihre freundschaftliche Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit am Institut für Tierernährung, vor allem während unserer Mittagspausen beim Baci.
- ... Stephan dafür, dass er immer akzeptiert hat, wenn ich mich zum Arbeiten zurückgezogen habe und dafür, dass er mich bei der Korrektur und Formatierung der Arbeit so tatkräftig unterstützt hat.
- ... Meiner Tante Sabine, die die Arbeit Korrektur gelesen hat, obwohl ihr das Thema so fremd ist.
- ... Meinen Freunden, die immer für mich da waren, wenn ich jemanden brauchte, der mir neue Kraft gibt und die mich immer unterstützt haben.
- ... Jette, die immer für mich da ist, mich von ganzem Herzen unterstützt und es mir so ermöglicht, den Weg zu gehen, den ich mir ausgesucht habe.

## SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

---

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Achim, 10.10.2009

Paula Brünig