

Enzyme

in der Tierernährung



Autoren:

Dr. M. Bühler

Dr. J. Limper

Dr. A. Müller

Dr. G. Schwarz

Prof. O. Simon

Dr. M. Sommer

Dr. W. Spring

Herausgeber und verantwortlich für den Inhalt:
**AWT (Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe
in der Tierernährung e. V.)**

Ansprechpartner: Dr. H.-C. Pape

Roonstraße 5

D-53175 Bonn

Tel. +49 228 352400

Fax +49 228 361397

E-Mail: info@AWT-feedadditives.de

Wirtschaftsverband AWT

Die AWT als deutscher Wirtschaftsverband mit internationaler Tätigkeit vertritt die fachlichen, wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Interessen der führenden Hersteller und Verarbeiter von Zusatzstoffen für die Tierernährung.

Aufgaben und Ziele

- Wahrnehmung der Mitgliederinteressen und deren Vertretung gegenüber Behörden, Regierungsstellen, gesetzgebenden Körperschaften, Fachorganisationen und anderen Institutionen auf nationaler Ebene
- Vertretung der deutschen Interessen für Zusatzstoffe auf internationaler Ebene
- Mitarbeit bei der Harmonisierung der Zulassungsbedingungen von Zusatzstoffen
- Unterrichtung und Beratung der Mitglieder in allen fachspezifischen Angelegenheiten und insbesondere über aktuelle Gesetzgebungsverfahren
- Information der Öffentlichkeit über Nutzen, Sicherheit und Qualität von Zusatzstoffen in der Tierernährung

Inhalt

1.	<i>Einleitung</i>	
1.1	Was sind Enzyme?	5
1.2	Historische Entwicklung	5
2.	<i>Einteilung und Eigenschaften von Enzymen</i>	
2.1	Nomenklatur der Enzyme	8
2.2	Endo- und Exo-Enzyme	10
2.3	Eigenschaften von Enzymen	11
3.	<i>Gewinnung und Einsatzgebiete</i>	
3.1	Produktionsverfahren	13
3.2	Einteilung der enzymproduzierenden Mikroorganismen	15
3.3	Anwendungsgebiete und Bedeutung	16
3.4	Einsatz in der Tierernährung	17
4.	<i>Substrate und deren Eigenschaften</i>	
4.1	Einteilung der Substrate	18
4.2	Gehalte in Futtermitteln	21
4.3	Wirkungen von NSP-Verbindungen und Phytat im Tier	23
5.	<i>Ziele des Enzymeinsatzes und Wirkungsprinzip</i>	
5.1	Ergänzung körpereigener Enzyme	25
5.2	Zufuhr von Enzymen, die vom Tier nicht gebildet werden	25
6.	<i>Futterenzyme im praktischen Einsatz</i>	
6.1	NSP-spaltende Enzyme	27
6.1.1	Auswirkungen auf das Tier und dessen Leistung	28
6.1.2	Einsatzmöglichkeiten im Mischfutter	29
6.1.3	Ökonomische Bewertung der Effekte	31
6.2	Phytasen	33
6.2.1	Wirkung von Phytase	34
6.2.2	Einsatzmöglichkeiten im Mischfutter	35
6.3	Andere Enzyme	37
7.	<i>Enzyme und Umwelt</i>	38
8.	<i>Analytik</i>	
8.1	Bestimmung der NSP-Enzymaktivitäten	40
8.2	Bestimmung der Phytaseaktivität	41
9.	<i>Anwendungsformen, Dosierung und Anwendersicherheit bei Enzymprodukten</i>	42
10.	<i>Definition häufig gebrauchter Begriffe</i>	44

1. Einleitung

1.1 Was sind Enzyme?

Enzyme sind

- Proteine
- Katalysatoren
- natürlich vorkommend
- hoch spezifisch.

Enzyme sind Proteine mit einer hochkomplexen, dreidimensionalen molekularen Struktur. Sie wirken nur unter ganz bestimmten Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert und Feuchtigkeitsgehalt) und nur mit ihren spezifischen Substraten.

Enzyme sind hoch effektive biologische Katalysatoren, die in allen biologischen Systemen anzutreffen sind. Sie beschleunigen chemische Reaktionen (z.T. um das 10^6 -fache), die unter den im Organismus vorherrschenden Bedingungen nur sehr langsam oder gar nicht ablaufen würden. Weiterhin ermöglichen erst Enzyme eine geordnete Aufeinanderfolge von chemischen Reaktionen in biologischen Systemen. Enzyme werden während der katalysierten Reaktion nicht verbraucht und kehren nach der abgelaufenen Reaktion wieder in ihren Ausgangsstatus zurück. Aus diesem Grund ist die benötigte Enzymmenge im Vergleich zur Substratmenge sehr gering.

Enzyme werden von allen Lebewesen (Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren) produziert und sind demnach obligat in allen Zellen sowie in extrazellulären Räumen enthalten. Enzyme, die über das Futter in den Verdauungstrakt gelangen, werden wie andere Eiweiße verdaut. Daher entstehen weder Rückstände in Kot oder Gülle, noch ist eine Wartezeit einzuhalten, bevor mit enzymhaltigen Rationen gefütterte Tiere geschlachtet werden.

Da Enzyme hochspezifisch für die zu katalysierende Reaktion sind, kann es vorteilhaft sein, eine Mischung aus verschiedenen Enzymen im Futter einzusetzen, um mehrere im Futter vorhandene nachteilige Stoffe gleichzeitig zu spalten. Dabei muss aber beachtet werden, dass die verwendeten Enzyme unter den gleichen Reaktionsbedingungen wirken. Ist diese Voraussetzung erfüllt (wie z.B. bei Multi-Enzymprodukten), sind sie in der Anwendung Einzelenzymen häufig überlegen.

1.2 Historische Entwicklung

Die Wirkung von Enzymen wird bereits seit Jahrtausenden in zahlreichen Prozessen der Lebensmittelgewinnung und -konservierung genutzt, ohne dass man über die Natur und die Eigenschaften von Enzymen ausreichende Kenntnisse besaß. Traditionelle Prozesse, wie die Herstellung von alkoholischen Getränken (Wein) und die Fermentation von

Teig wurden bereits auf ägyptischen Wandbildern dargestellt. Bei diesen Verfahren wurden meist lebende Mikroorganismen den pflanzlichen oder tierischen Rohstoffen zugesetzt. Diese Mikroorganismen wie z.B. Hefen und Milchsäurebakterien (*Lactobazillen*) wiederum produzierten die für die gewünschte Umsetzung erforderlichen Enzyme. Weitere Anwendungsbeispiele für Enzyme sind die Haltbarmachung von Weißkohl durch Zusatz von Lactobazillen sowie die Käseherstellung als Form der Haltbarmachung von Milch und Milchbestandteilen.

Enzyme sind an allen Lebensvorgängen beteiligt. Ihre eigentliche Existenz wurde erst im 19. Jahrhundert aufgeklärt.

Pasteur konnte 1857 nachweisen, dass die Gärung mit der Lebenstätigkeit von Hefen im engen Zusammenhang steht. Der Begriff „Enzyme“ wurde 1878 von Kühne für „lösliche Fermente“ geprägt, die nicht an die lebende Zelle gebunden sind. Diese Bezeichnung leitet sich von dem griechischen Wort „enzyme“ ab und bedeutet soviel wie „in Sauerteig“.

Den entscheidenden Beweis für die Wirkung von Enzymen lieferte Buchner im Jahr 1897, indem er nachweisen konnte, dass auch der zellfreie Presssaft von Hefezellen die alkoholische Gärung bewirken kann. Ostwald (1893) wiederum erkannte die katalytische Wirkung von Enzymen. Im Jahre 1909 entdeckte Röhm die Wirksamkeit von Proteasen

tierischer Herkunft (aus Pankreas) beim Beizen von Häuten zur Lederherstellung.

Die systematische Entwicklung technischer Enzyme begann mit der Gewinnung eines Gemisches kohlenhydrat- (Carbohydrasen) und eiweißspaltender (Proteasen) Enzyme aus einem Schimmelpilz (*Aspergillus oryzae*) durch den Japaner Takamine im Jahr 1894. Ein Jahr später wurde bereits von Boidin ein Verfahren zur Gewinnung von Alkohol aus Getreide entwickelt, bei dem ebenfalls ein Schimmelpilz zur Anwendung kam. Die Enzyme dieses Schimmelpilzes bewirken die Verzuckerung der im Getreide enthaltenen Stärke. Die hier anfallenden Zucker werden anschließend durch Hefen zu Alkohol vergoren.

Im 19. Jahrhundert ist es trotz intensiver Forschungsarbeiten nicht gelungen, die chemische Struktur der Enzyme zu ermitteln. Erst 1926 konnte James Sumners anhand der Urease nachweisen, dass Enzyme Proteine sind.

Nach dem 2. Weltkrieg setzte dann eine starke Entwicklung zur Produktion von Stoffen mittels Fermentationstechnik ein, die anfänglich vor allem zur Gewinnung von Antibiotika sowie Pilz- und Bakterienamylasen diente. Die überwiegende Zahl an kommerziell wichtigen Enzymen wird heute mittels Mikroorganismen (Pilze, Hefen und Bakterien) gewonnen. Aber auch Enzympräparate aus tierischen Geweben (z.B. Lipasen

und Proteasen aus Pankreas) und Pflanzen (z.B. Papain, eine Protease aus Papayafrüchten) spielen heute noch eine wichtige Rolle in der technischen Anwendung von Enzymen.

Proteasen und Carbohydrasen stellen heute unter den mikrobiell erzeugten Enzymen die kommerziell bedeutendsten Produktgruppen dar. Als wichtigste Absatzmärkte sind die Waschmittelinindustrie gefolgt von Stärkegewinnung und Milchverarbeitung zu nennen. Die Anwendung in der Tierernährung war bis Mitte der 80er Jahre nur von untergeordneter Bedeutung. Eingesetzt wurden sie vor allem in Regionen wie z.B. Kanada, Skandinavien und der ehemaligen DDR, wo die begrenzte Verfügbarkeit hochverdaulicher Rohstoffe (z.B. Mais) dies erforderte. Die bis dahin mit dem Einsatz von Enzymen, die ursprünglich für andere Einsatzzwecke entwickelt wurden, erzielten zootechnischen Effekte ließen einen Einsatz in der Tierernährung meist nicht interessant erscheinen. Erst die Vermarktung von eigens für die Tierernährung entwickelten Enzympräparaten verschaffte diesen Produkten eine erhöhte Aufmerksamkeit.

Futterenzyme sind das Ergebnis eines mehrjährigen, kostenintensiven Forschungs- und Entwicklungsprozesses. Ihrer wachsenden Bedeutung entsprechend wurden sie 1993 als neue Stoffgruppe in der Richtlinie 70/524/EWG

über Zusatzstoffe in der Tierernährung erfasst und sind damit europaweit futtermittelrechtlich geregelt. Sie durchlaufen ein strenges Zulassungsverfahren durch die Europäische Kommission, Generaldirektion Landwirtschaft. Erst nach eingehender Prüfung durch die zuständigen Behörden und Wissenschaftsgremien der 15 Mitgliedsstaaten wird nach einem mehrstufigen Verfahren die EU-weite Zulassung erteilt. Neben Wirksamkeit und Qualität eines Zusatzstoffes stehen vor allem die Sicherheit für Mensch und Tier sowie der Schutz der Umwelt im Mittelpunkt der Prüfungen.

2. Einteilung und Eigenschaften von Enzymen

2.1 Nomenklatur der Enzyme

Zu Beginn ihrer Erforschung erhielten die Enzyme fast ausschließlich Trivialnamen. Beispiele hierfür sind Bezeichnungen wie „Zwischenferment“ oder „pH-5-Enzym“. Während viele dieser Namen heute vergessen sind (wie Ptyalin, ein stärke-spaltendes Enzym des Speichels), werden andere Namen wie Pepsin oder Trypsin auch heute noch verwendet. Etwa seit der Jahrhundertwende wurden Enzyme durch die Nachsilbe `ase´ gekennzeichnet. Diese Konvention hat sich seitdem weltweit durchgesetzt, so dass alle Enzyme mit dieser Nachsilbe benannt werden. 1961 hat eine internationale Kommission (Enzyme Commission: E.C.) bestimmte Regeln für die systematische Einteilung der Enzyme aufgestellt. Dabei werden die Enzyme nach der Art der Reaktion, die katalysiert wird, in 6 Hauptklassen eingeteilt.

Enzymhauptklassen:

1. Oxidoreduktasen
2. Transferasen
3. Hydrolasen
4. Lyasen
5. Isomerasen
6. Ligasen

Die in der Tierernährung als Zusatzstoffe verwendeten Enzyme sind ausschließlich Hydrolasen.

Innerhalb der Hydrolasen mit der E.C.-Nr. 3, die C-O, C-N, C-C und einige andere chemische Bindungsstellen spalten, wird nach der Art der zu spaltenden Molekülgruppe unterschieden. Folgende Hydrolasen können für die Anwendung als Futterzusatzstoffe von Bedeutung sein:

- E.C. 3.1 Phosphatasen (z.B. Phytase)
- E.C. 3.2 Glycosidasen (z.B. Carbohydrasen)
- E.C. 3.4 Proteasen

Jeder Molekülgruppe sind eine Reihe von spezifischen Bindungsarten eigen. So unterteilen sich z.B. die Glycosidasen weiter in:

- E.C. 3.2.1 O-Glycosid spaltende Hydrolasen
- E.C. 3.2.2 N-Glycosid spaltende Hydrolasen
- E.C. 3.2.3 S-Glycosid spaltende Hydrolasen

Nur die O-Glycosid spaltenden Hydrolasen sind für den Einsatz in der Tierernährung relevant.

Die letzte Stelle des vierstelligen E.C.-Codes steht für das umzusetzende Molekül selbst. Im Folgenden werden beispielhaft einige Enzyme aus der Gruppe der Glycosidasen aufgeführt:

- E.C. 3.2.1.1 Alpha-Amylase
- E.C. 3.2.1.3 Glucoamylase
- E.C. 3.2.1.4 Cellulase
(1,4 β -D-Glucanase)
- E.C. 3.2.1.6 Beta-Glucanase
(1,3-1,4 β -D-Glucanase)
- E.C. 3.2.1.8 Xylanase
(1,3-1,4- β -D-Xylanase)

Die folgende Tabelle (*Tabelle 1*) soll die Systematik der Enzymklassifizierung nach dem E.C.-Code beispielhaft veranschaulichen:

Neben einer geläufigen Bezeichnung legt die Enzymkommission einen systematischen Namen für jedes Enzym fest, der Zweideutigkeiten möglichst vermeiden soll. Für die Xylanase lautet beispielsweise der systematische Name 1,4- β -D-Xylan-Xylanohydrolase.

Aufgrund dieser Einteilung erhalten die Enzyme eine vierstellige Klassifizierungsnummer (E.C.-Nr.), wobei dieses System nicht für Futterenzyme spezifisch ist, sondern alle bekannten Enzyme umfasst. Manchmal findet man anstatt der E.C.-Nummer eine IUB-Nummer, die von der „International Union of Biochemistry“ veröffentlicht wurde. E.C.- und IUB-Nummer verwenden jedoch den gleichen vierstelligen Code und sind daher identisch.

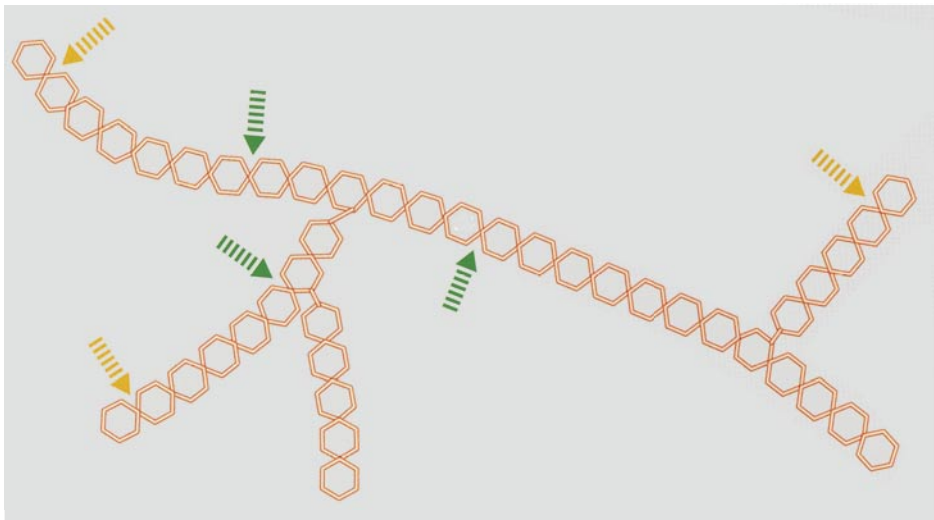
Tabelle 1
Einteilung der
Enzyme nach
dem E.C.-Code

Hauptgruppe (1. Stelle des Codes)	1. Untergruppe (2. Stelle des Codes)	2. Untergruppe (3. Stelle des Codes)	Spezifisches Enzym (4. Stelle des Codes)
Art der katalysierten Reaktion z.B. Hydrolyse (E.C. 3)	Art der zu spaltenden Stoffgruppe z.B. Hydrolasen, die Kohlenhydrate spalten (E.C. 3.2.)	Art der zu spaltenden Bindung innerhalb der Stoffgruppe z.B. Kohlenhydrat spaltende Hydrolasen, die die O-glycosidische Bindung spalten (E.C. 3.2.1.)	Kennzeichnung des für ein Substrat spezifischen Enzyms z.B. Xylanase zur Spaltung des spezifischen Kohlenhydrates Xylan (E.C. 3.2.1.8)

2.2 Endo- und Exoenzyme

Für die in der Tierernährung verwendeten Enzyme ist die Spaltungsstelle des Substrates für den zu erzielenden Effekt von großer Bedeutung. Prinzipiell wird zwischen Exo- (Außen) und Endo- (Innen) Enzymen unterschieden. Exo-Enzyme spalten nur die endständigen Bausteine des Molekülstranges ab, während Endo-Enzyme Bindungen innerhalb des Molekülstranges spalten (*siehe Abbildung 1*). Endo-Enzyme können daher große und langkettige Moleküle effektiv in kleinere Bruchstücke spalten. Dies ist vor allem für den Einfluss der Nicht-Stärke-Polysaccharidspaltenden Enzyme auf die Viskosität des Verdauungsbreies von Bedeutung.

Abbildung 1
Schematische Darstellung der Angriffspunkte von Exoenzymen und Endoenzymen an einem verzweigten Molekülstrang



2.3 Eigenschaften von Enzymen

Neben der spezifischen Spaltungsstelle im Molekül wird die Effektivität eines Enzymes weiterhin maßgeblich von den am Wirkungsort vorliegenden Reaktionsbedingungen beeinflusst, wobei man unter Reaktionsbedingungen pH-Wert, Temperatur, Wassergehalt, Anwesenheit von Aktivatoren oder Inhibitoren sowie Substratkonzentration versteht. Je nach Herkunft, d. h. dem verwendeten Produktionsstamm, unterscheiden sich Enzyme ganz erheblich in ihrer Aktivität in Abhängigkeit von den

Reaktionsbedingungen. Während man in der Waschmittelindustrie an Enzymen interessiert ist, die bei z.B. 60° C eine hohe Aktivität besitzen, werden für die Tierernährung Enzyme benötigt, die im Bereich von 40° C gut wirken. Dennoch wird für Enzyme, die als Futterzusatzstoffe verwendet werden sollen, eine hohe Temperaturstabilität angestrebt, damit bei Pelletiertemperaturen von 70-80° C keine Inaktivierung erfolgt. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität ist in *Abbildung 2* dargestellt.

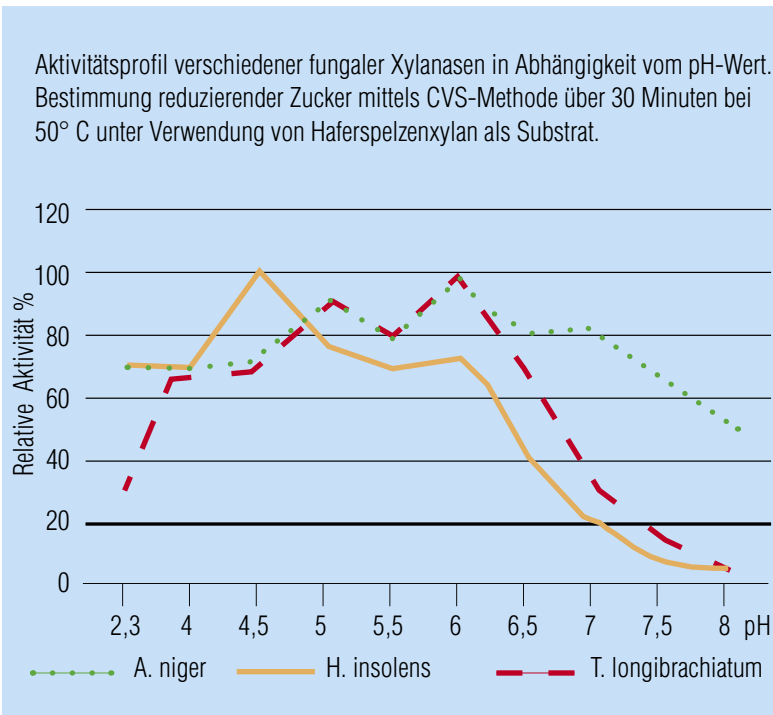


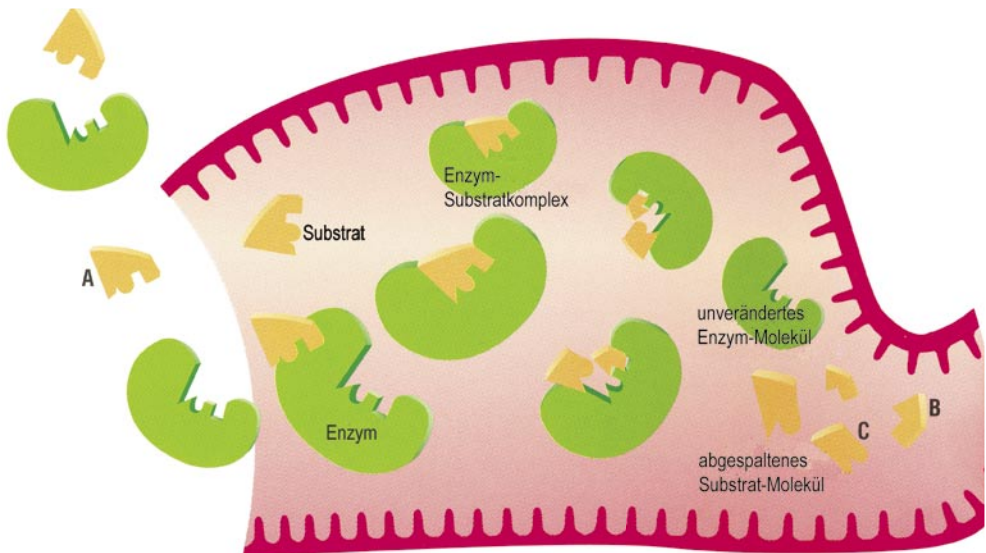
Abbildung 2
Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität von Xylanasen

Enzyme besitzen eine hohe Spezifität, d. h. jedes Enzym spaltet nur ganz spezifische Substrate. In diesem Zusammenhang spricht man vom so genannten Schlüssel-Schloss-Prinzip. Das folgende Diagramm (*Abbildung 3*) zeigt die Wirkungsweise von Enzymen:

Substrat A bildet mit dem Enzym einen Enzym-Substratkomplex, aus dem die Reaktionsprodukte B und C sehr viel schneller frei werden, als es ohne Enzyme möglich wäre. Ein Beispiel für eine enzymatische Spaltung ist die Reaktion des Enzyms Trypsin mit einem Polypeptid (Substrat A), das in verschiedene Peptide (Produkte B und C) gespalten wird. Am Ende der Reaktion steht das unveränderte Enzym erneut zur Spaltung eines Polypeptids zur Verfügung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Futterenzyme hinsichtlich ihrer Reaktionsbedingungen an die im Verdauungstrakt der Tiere vorliegenden Reaktionsbedingungen angepasst sein müssen. Sie müssen entweder unter den im Magen vorliegenden sauren pH-Verhältnissen wirksam sein oder den niedrigen pH im Magen sowie die proteolytische Wirkung des Pepsins im Magen unbeschadet überstehen, um in den folgenden Abschnitten des Verdauungstraktes wirken zu können. Dieser Sachverhalt muss dementsprechend bei der Selektion von Enzymen zum Einsatz in der Tierernährung berücksichtigt werden.

Abbildung 3
Wirkungsweise von Enzymen



3. Gewinnung und Einsatzgebiete

3.1 Produktionsverfahren

Enzyme werden heute überwiegend mit Hilfe von Mikroorganismen, insbesondere Pilzen und Bakterien, hergestellt. Dies ist in der Regel ökonomischer als die Enzym-Gewinnung aus pflanzlichen oder tierischen Ausgangsmaterialien. Darüber hinaus sind Mikroorganismen zur Synthese eines sehr breiten Spektrums hydrolytischer Enzyme fähig, zu deren Bildung der tierische Organismus zum großen Teil nicht in der Lage ist. Da viele Mikroorganismen an extreme Lebensbedingungen angepasst sind (Temperatur, pH, Osmolarität), sind mikrobielle Enzyme in vielen Fällen in dieser Hinsicht auch stabiler als Enzyme von Pflanzen und Tieren. Einen weiteren Vorteil stellt die bessere Standardisierbarkeit von mikrobiellen Enzympräparaten dar. Es werden solche Pilz- und Bakterienstämme eingesetzt, die unter industriellen Produktionsbedingungen zu schneller Vermehrung und hoher Biosyntheseleistung fähig sind. Ziel ist dabei nicht nur eine hohe Enzymkonzentration, sondern auch eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute.

Entsprechend geeignete Stämme werden entweder aus der Wildpopulation selektiert und weiterentwickelt, oder aber man überträgt mittels gentechnischer Methoden gezielt Erbinformationen für bestimmte Enzyme auf geeignete Produktionsstämme. Dabei sucht man insbesondere nach solchen,

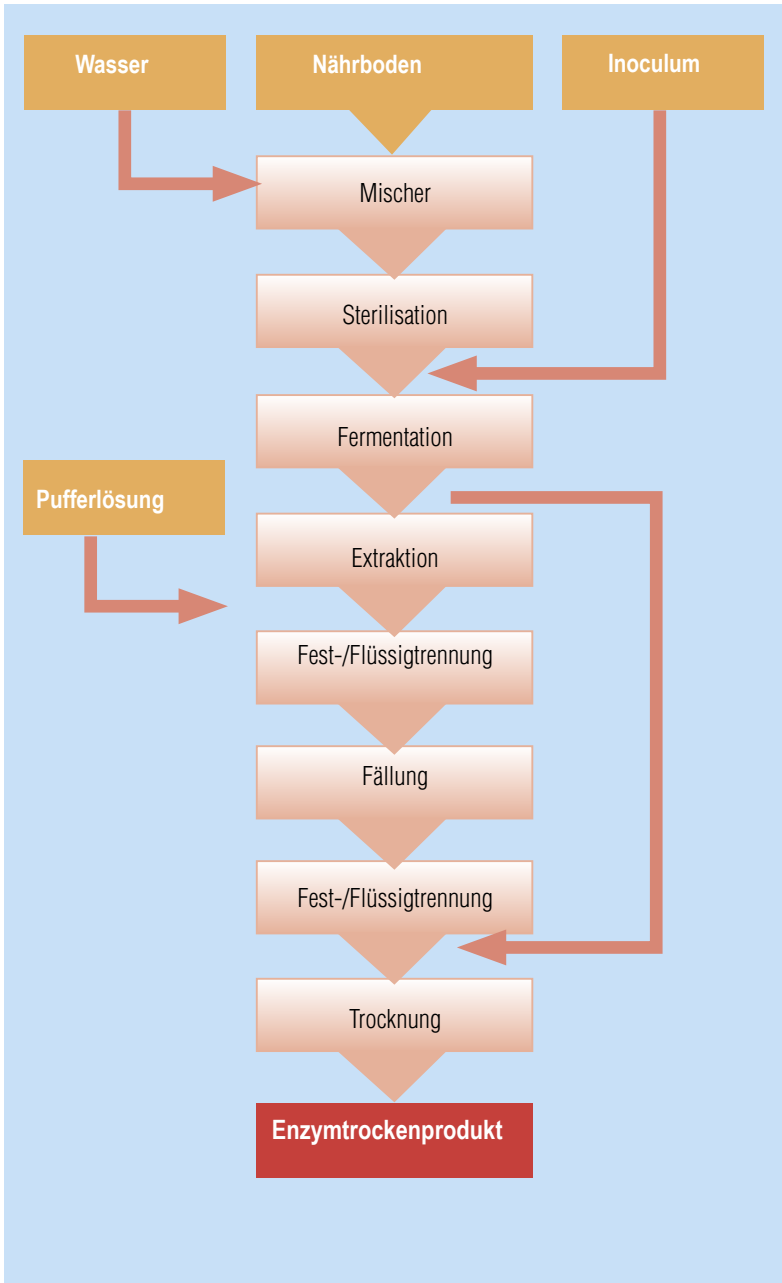
die das oder die gewünschten Enzyme in möglichst großen Mengen und unter Verwendung spezifischer Nährmedien synthetisieren. Die Gentechnik ermöglicht eine ressourcenschonende Produktion. Um einen besonders geeigneten Stamm zu finden, müssen Hunderte von verschiedenen Stämmen in speziellen Screening-Verfahren getestet werden. Damit es letztendlich im Produktionsverfahren zur Synthese der gewünschten Enzymaktivitäten kommt, ist die Auswahl des richtigen Mikroorganismus wichtig. Aber auch die Zusammensetzung des Nährmediums spielt eine mitentscheidende Rolle. So induziert z. B. bei bestimmten Stämmen die Anwesenheit von Stärke die Bildung von Amylasen, die Anwesenheit von Casein oder Albumin dagegen die Bildung von Proteasen.

Bei der Herstellung von Enzymen im industriellen Maßstab unterscheidet man zwischen

- Emersverfahren und
- Submersverfahren

Wesentliches Merkmal des Emersverfahrens (Feststoff-, Oberflächenfermentation) ist die Kultivierung auf festen oder pastösen Nährmedien mit Oberflächenbelüftung. Nach Abschluss der Fermentation werden die Feststoffe homogenisiert, auf eine Feuchtigkeit von 10-12% eingestellt und vermahlen. Das so gewonnene Pulver kann bereits als Enzympräparat für die industrielle

Abbildung 4
Schematische
Darstellung
der Enzym-
Gewinnung
mittels Emers-
verfahrens



Nutzung verwendet werden, wobei lebensfähige Formen des Produktionsorganismus nicht im Produkt enthalten sein dürfen, was durch entsprechende Maßnahmen sichergestellt wird. Einige Anwendungen erfordern jedoch eine weitergehende Aufarbeitung des Fermentationsproduktes. Dazu wird ein Extrakt erstellt, aus dem das Enzym auf verschiedenen Wegen (z.B. Ultrafiltration, Fällung) gewonnen werden kann. (*Abbildung 4*)

Weitaus häufiger als das arbeits- und kostenintensive Emersverfahren wird mittlerweile das Submersverfahren angewandt. Bei diesem Verfahren werden die enzymproduzierenden Mikroorganismen nicht auf der Oberfläche, sondern innerhalb eines flüssigen Nährmediums kultiviert. Es bietet eine Reihe von Vorteilen, so unter anderem eine bessere Kontrolle der Zusammensetzung des Nährmediums, des pH-Wertes, der Temperatur und Belüftung. Des Weiteren besteht ein verringertes Risiko von Fremdfektionen. Es kann bei fast allen relevanten Mikroorganismen zum Einsatz kommen. Den Ablauf einer Submersfermentation zeigt das Schema in *Abbildung 5*.

Die hierbei gewonnenen Fermentationsprodukte werden aufgereinigt, standardisiert und einer Qualitätskontrolle unterzogen. Sie werden in fester und flüssiger Form vermarktet.

3.2 Einteilung der enzymproduzierenden Mikroorganismen

Als enzymproduzierende Mikroorganismen werden verschiedene Pilze, Bakterien und zum Teil auch Hefen eingesetzt. Für diese Mikroorganismen ist die Enzymproduktion essentiell, da sie ihre eigenen Lebensfunktionen mit Hilfe der von ihnen produzierten Enzyme über Substratspaltung und Metabolisierung aufrechterhalten. Speziell selektierte Stämme oder gentechnisch veränderte Organismen können darüber hinaus weitaus größere Enzymmengen produzieren.

Die in der Futtermittelherstellung verwendeten Enzyme stammen von Mikroorganismen, die in der Natur weit verbreitet vorkommen oder über die langjährige Erfahrungen beim Einsatz in der Lebens- bzw. Futtermittelindustrie vorliegen. Durch umfangreiche Untersuchungen ist deren Sicherheit in Produktion und Anwendung belegt.

Jeder Produktionsstamm muss bei einer dafür anerkannten Stammsammlung (gemäß Budapester Vereinbarung) hinterlegt sein. Name und Ort dieser Stammsammlung, Lagerungsnummer sowie alle zur Identifizierung notwendigen Eigenschaften des Produktionsstammes sind den Zulassungsbehörden bekannt zu geben, bevor eine Zulassung als Futterzusatzstoff für das Enzym erteilt wird.

Unter den enzym-produzierenden Mikroorganismen stellen Pilze die größte Gruppe dar. Die wichtigsten Gattungen sind: *Aspergillus ssp.*, (z.B. *A. niger*), *Penicillium ssp.*, *Humicola ssp.* (z.B. *H. insolens*) sowie *Trichoderma ssp.* (z.B. *T. longibrachiatum*). Diese Pilze produzieren Enzyme zum Abbau unterschiedlichster Substrate; allen gemeinsam ist jedoch die Produktion von Enzymen zur Spaltung von pflanzlichen Zellwandbestandteilen in Form hochpolymerer Kohlenhydrate.

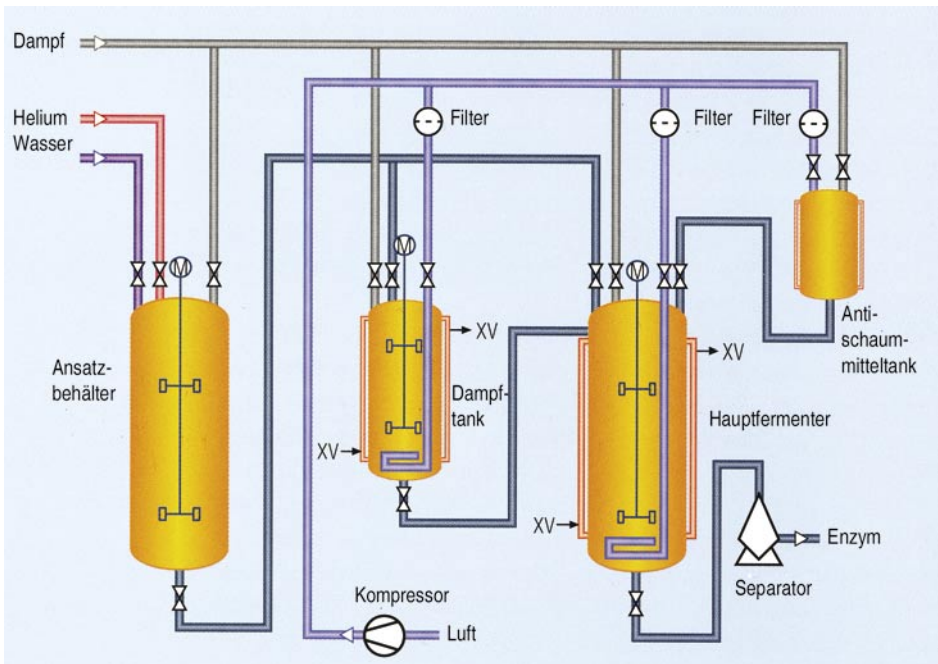
Aus der Gruppe der Bakterien sind für die Tierernährung die *Bacillus*

ssp. von besonderer Bedeutung. Vor allem Alpha-Amylasen und Proteasen werden von *Bacillus ssp.* produziert, wobei *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* häufig verwendet werden; aber auch β -Glucanasen und Xylanasen können von *Bacillus*-Arten erzeugt werden.

Abbildung 5
Prinzip der Enzym-Gewinnung mittels Submers-Verfahrens

3.3 Anwendungsgebiete und Bedeutung

Die Größe des Weltmarktes für industriell hergestellte Enzyme hat sich in den letzten 25 Jahren mehr als verzehnfacht und beträgt heute deutlich



über 1 Mrd. DM. Der Markt für Futterenzyme hat daran zwar noch einen relativ kleinen Anteil, gehört jedoch zu den am schnellsten wachsenden Segmenten.

Enzyme werden in folgenden Bereichen angewendet:

- Diagnostika und medizinische Therapie
- Kosmetika
- Lebensmittelindustrie (Milchverarbeitung, Alkoholherstellung, Fruchtsaftherstellung, Backwaren)
- Lederindustrie
- Papierindustrie
- Stärkeindustrie
- Textilindustrie
- Tierernährung
- Waschmittelindustrie

Enzyme leisten innerhalb der aufgezeigten Einsatzgebiete vielfältige Beiträge zur Wirtschaftlichkeit von Produktionsprozessen. So können Enzyme Ausbeute und Rohstoffnutzung verbessern, Herstellungskosten reduzieren, die Haltbarmachung von Produkten unterstützen sowie technologische Eigenschaften von Prozesshilfsstoffen oder Endprodukten positiv verändern.

3.4 Einsatz in der Tierernährung

Eigens für den Einsatz in der Tierernährung entwickelte und hergestellte Enzyme sind innerhalb der breiten Palette von Industrieenzymen eine noch sehr

junge Produktgruppe, wenngleich erste Versuche, insbesondere an Geflügel und Ferkeln, bereits mehr als 50 Jahre zurückliegen.

Enzyme konnten sich anfangs nicht durchsetzen, weil die eingesetzten Präparate ursprünglich für andere Zwecke entwickelt wurden. Sie wiesen deshalb bei ihrer Verwendung in der Tierernährung nur eine unzureichende und wechselhafte Wirksamkeit auf, da sie den verdauungsphysiologischen Anforderungen meist nicht entsprachen.

Hinzu kam, dass die Fermentations-technologien der damaligen Zeit zu wesentlich geringeren Enzymausbeuten als heutzutage führten, wodurch die zur Verfügung stehenden Enzyme zu teuer und damit für den Einsatz in der Tierernährung ökonomisch uninteressant waren.

Die stetige Weiterentwicklung der Herstellungsprozesse unter Einbeziehung der Gentechnologie hat, in Verbindung mit einer anwendungsorientierten Produktentwicklung, dazu geführt, dass Enzyme heute fester Bestandteil moderner Fütterungssysteme sind.

Die beiden bedeutendsten Produktkategorien innerhalb der in der Tierernährung derzeit eingesetzten Enzyme stellen die Phytase sowie die Enzyme zum Abbau von Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP-spaltende Enzyme) dar.

4. Substrate und deren Eigenschaften

4.1 Einteilung der Substrate

Die durch Futterenzyme abzubauenen Substrate lassen sich prinzipiell in drei Hauptgruppen unterteilen:

a) Substrate, für die monogastrische Tiere im Verdauungstrakt selbst die geeigneten Enzyme synthetisieren (Stärke, Proteine, Lipide).

Stärke z.B. besteht aus Amylose und Amylopektin. Diese sind aus α -glycosidisch verbundenen Glucosemolekülen (Abbildung 6) in 1,4- bzw. 1,4- und 1,6-Konfiguration zusammengesetzt. Alle zum vollständigen Abbau der Stärke bis zur absorbierbaren Glucose benötigten Enzyme (α -Amylase, Glucoamylase, Maltase, Isomaltase, Maltotriase, β -Glucosidase) werden vom monogastrischen Tier gebildet, sind aber unter bestimmten Bedingungen, wie bei Jungtieren und hier insbesondere unter Stressbedingungen, u.U. nicht in ausreichender Menge vorhanden. Dies gilt auch für Proteasen und Lipasen.

b) Substrate, für die vom tierischen Organismus keine eigenen Enzyme gebildet werden und die eine sehr niedrige Verdaulichkeit aufweisen (z.B. Cellulose).

Cellulose besteht aus linearen Ketten von mehreren Tausend Glucosemolekülen. Diese sind β -glycosidisch verknüpft (*Abbildung 7*) und deshalb für Monogastrier praktisch unverdaulich und können nur teilweise durch Mikroorganismen im Darmtrakt (geringe energetische Ausnutzung) gespalten werden.

c) Substrate, für die vom tierischen Organismus keine eigenen Enzyme gebildet werden und die darüber hinaus antinutritive Wirkungen haben (z.B. 1,3-1,4- β -Glucane, Pentosane, Phytat).

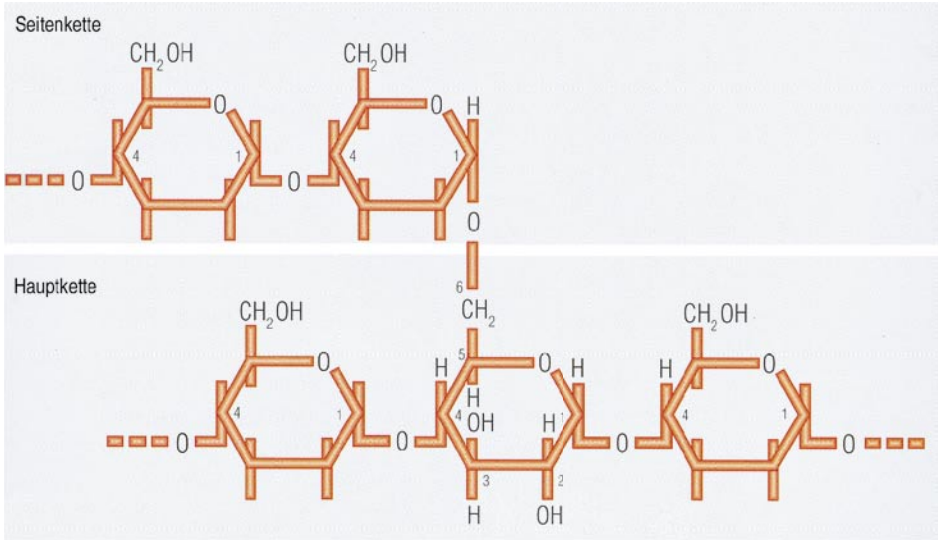


Abbildung 6
Ausschnitt aus Amylopektin.
Die Glucosemoleküle sind in 1,4-Bindung
bzw. 1,6-Bindung miteinander verknüpft.

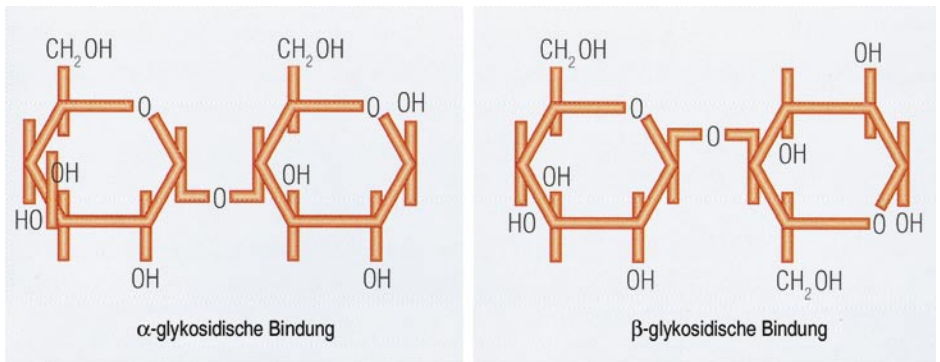
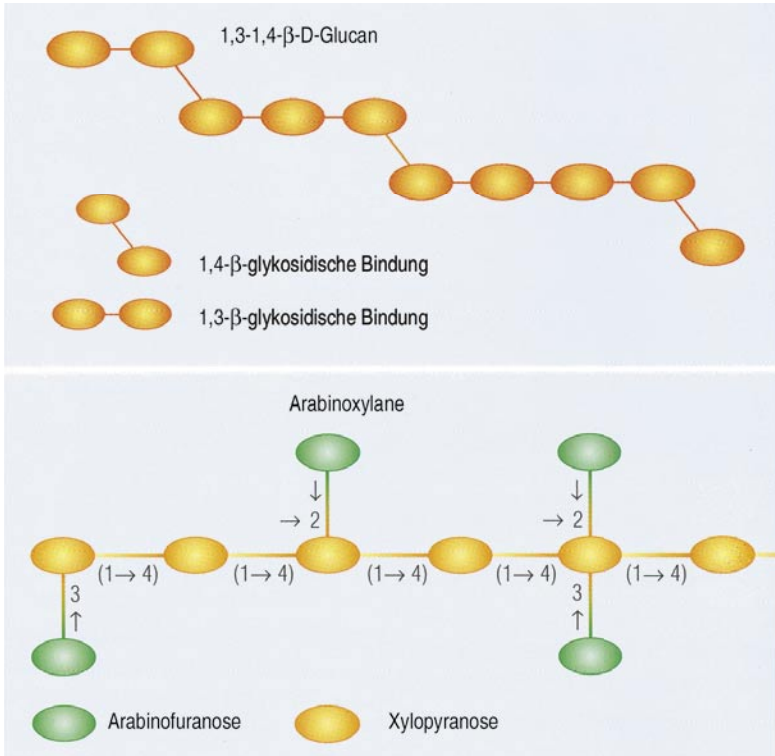


Abbildung 7
 α - und β -glykosidische Bindung

Abbildung 8
Schematische Darstellung des Aufbaus von 1,3-1,4- β -Glucanen und Arabinoxyylanen



1,3-1,4- β -Glucane sind genau wie Cellulose aus β -glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen (**Abbildung 8**) aufgebaut. Neben den 1,4-Bindungen, wie sie für die Cellulose charakteristisch sind, weisen sie aber zusätzlich 1,3-Bindungen auf. Diese sind für die starke Verzweigung dieser β -Glucane und die Möglichkeit der Wassereinlagerung (Quellung) und damit u.a. für die antinutritive Wirkung (Viskositätssteigerung) verantwortlich.

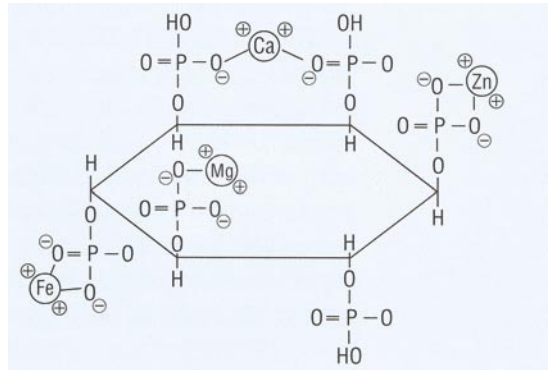
Eine ebenfalls stark viskositätserhöhende und somit antinutritive Wirkung haben Pentosane, die in Roggen und Weizen hauptsächlich als Arabinoxylane vorliegen. Die Arabinoxylane bestehen aus einer Hauptkette aus Xylopyranose und Seitenketten aus Arabinofuranose. Eine schematische Darstellung des Aufbaus von 1,3-1,4- β -Glucanen und Arabinoxylanen ist **Abbildung 8** zu entnehmen.

Neben diesen zu den Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) gehörenden Substanzen gibt es vor allem in pflanz-

lichen Eiweissträgern (Leguminosen, Raps) höhere Gehalte an spezifischen unverdaulichen Oligosacchariden (α -Galactoside, z.B. Raffinose, Stachyose, Verbascose). Dabei handelt es sich im Wesentlichen um kurzkettige Verbindungen (3-5 Moleküle) aus Glucose und Galactose-Einheiten.

Einen weiteren wichtigen schlecht verdaulichen Futterinhaltsstoff stellen die Phytinsäure und deren Salze (Hexaphosphorsäureester des Inositols) dar (Abbildung 9).

Die Salze der Phytinsäure heißen Phytate. Die maximal sechs Phosphatgruppen des Inositol-Ringes können verschiedene Kationen, wie z.B. Calcium, Magnesium, Eisen und Zink in festen Komplexen binden und somit deren Verfügbarkeit beeinträchtigen.



4.2 Gehalte in Futtermitteln

Abbildung 9
Struktur von Phytat

Der Gehalt der NSP-Fractionen in den Futtermitteln schwankt teilweise erheblich. Er ist neben der Pflanzenart und -sorte vor allem von klimatischen Bedingungen, dem Anbaustandort und dem Erntezeitpunkt abhängig. In **Tablelle 2** sind die NSP-Gehalte ausgewählter Futtermittel dargestellt.

Tablelle 2
Gehalte an Phosphor, Phytinphosphor, Rohfaser und verschiedenen NSP-Fractionen in ausgewählten Futtermitteln (Angaben in g/kg TS)

Futtermittel	Rohfaser	β -Glucane	Pentosane	NSP gesamt	Phosphor	Phytinphosphor
Weizen	20-34	2-15	55-95	75-106	3,8	2,3-2,9
Roggen	22-32	5-30	75-91	107-128	3,9	2,5
Triticale	30	2-20	54-69	74-103	4,5	*
Gerste	42-93	15-107	57-70	135-172	4	2,2-2,9
Hafer	80-123	30-66	55-69	120-296	3,9	2,1
Mais	19-30	1-2	40-43	55-117	3,1	2,1
Weizenkleie	106-136	*	150-250	220-337	12	7,2-9,2
Sojaschrot	34-99	*	30-45	180-227	7,4	4,4
Rapsschrot	109-159	*	*	187	11,4	6,8-8,3
Futtererbsen	56-72	*	*	156	4,8	1,9-2,4

* keine Angaben

Bei den einheimischen Getreidearten dominieren dabei die Pentosane. Roggen, Hafer und Gerste enthalten daneben bedeutende Anteile an β -Glucanen, wobei zu berücksichtigen ist, dass unter europäischen klimatischen Bedingungen die in *Tabelle 2* aufgeführten Extremwerte nicht erreicht werden. So liegt der β -Glucan-Gehalt der Gerste in Deutschland meist im Bereich von 30-45 g/kg TS. Der Gesamtgehalt an β -Glucanen oder an Pentosanen im Getreide lässt allerdings noch keine Aussage über einen möglichen antinutritiven Effekt zu. Entscheidend ist auch der lösliche Anteil dieser Verbindungen, denn nur lösliche β -Glucane oder Pentosane führen zur Viskositätsbildung. So ist ein antinutritiver Effekt von Gerste primär auf die 1,3-1,4- β -Glucane zurückzuführen, weil deren löslicher Anteil wesentlich höher ist als der der Pentosane. Ferner kann der lösliche Anteil von Pentosanen im Weizen sorten- und chargenabhängig sein.

In pflanzlichen Futtermitteln liegen ca. 50-80 % des Phosphors als Phytat (Verbindung mit Calcium-, Magnesium-, Zink- und anderen zweiwertigen Kationen) gebunden vor (*Tabelle 2*). Phosphat aus der Phytinsäure kann nur durch das Enzym Phytase (wird von monogastrischen Tieren praktisch nicht gebildet) gespalten und damit für das Tier nutzbar gemacht werden.

Pflanzliche Gerüstsubstanzen können aus chemischer Sicht als die Summe aus NSP und Lignin definiert werden. Neben den Pentosen (Arabinose und Xylose) und Hexosen (Glucose, Mannose und Galactose) enthalten sie Desoxyhexosen (Rhamnose, Fucose) und Hexauronsäuren (Galacturonsäure).

Die Möglichkeiten der Charakterisierung verschiedener schlecht verdaulicher Futterinhaltsstoffe haben sich in den letzten Jahren sehr verbessert. So ist es heute mit verschiedenen Methoden möglich, z.B. Phytat und Phytin-Phosphor, β -Glucane, Pentosane, Pectine und Cellulose zu analysieren. Damit ist eine bessere Beurteilung der Futtermittel hinsichtlich der Verwertung im Tier möglich als z.B. anhand des Rohfasergehaltes. So wird mit dem Rohfasergehalt der Futtermittel die besonders bedeutsame Fraktion der löslichen NSP nicht erfasst. Wie aus *Tabelle 2* ersichtlich, liegt der NSP-Gehalt um ein Vielfaches höher als der entsprechende Gehalt an Rohfaser.

Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass diese analytisch ermittelbaren NSP-Fraktionen in den pflanzlichen Zellwänden in unterschiedlichen Komplexbindungen untereinander und mit anderen Nährstoffen (Proteine, Mineralstoffe) vorliegen, was eine Charakterisierung hinsichtlich der Beeinflussung des Futterwertes erschwert.

4.3 Wirkungen von NSP-Verbindungen und Phytat im Tier

Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand lassen sich diesen Futterinhaltsstoffen folgende negative Wirkungen zuordnen:

Einfluss auf Energiedichte („Verdünnungseffekt“)

Sie sind schlecht verdaulich und verdünnen damit den verwertbaren Energie- und Nährstoffgehalt im Futter (dies trifft für alle NSP-Fractionen, Oligosaccharide, Lignin und Phytin-Phosphor zu).

Einschluss von Nährstoffen („Käfigeffekt“)

Als Hauptbestandteile der pflanzlichen Zellwand üben einige Inhaltsstoffe einen so genannten „Käfigeffekt“ aus, d.h. sie umhüllen andere ansonsten hochverdauliche Nährstoffe wie z.B. Stärke, Fett oder Protein (betrifft hauptsächlich die unlöslichen Anteile der NSP, die in den unterschiedlichen Zellwandstrukturen vorliegen).

Erhöhung der Digesta-Viskosität

Bestimmte NSP-Fractionen (hauptsächlich die löslichen Anteile der β -Glucane und Pentosane sowie die Pectine) und bestimmte Glycoproteine, also Verbindungen von Kohlenhydraten und Proteinen, wirken im Verdauungstrakt viskositätssteigernd, d.h. sie lagern große Mengen Wasser ein (Quellung) und der Verdauungsbrei wird mehr

oder weniger viskos und klebrig. Diese Viskositätssteigerung verschlechtert die Nährstoffabsorption im Darm und kann zu einer negativen Beeinflussung der Kotkonsistenz bis hin zu Durchfallerscheinungen führen. Infolge einer erhöhten Digesta-Viskosität kann es zu einer Verlangsamung der Futterpasserate und u.U. zu einer Verringerung der Futteraufnahme kommen. Des Weiteren wird die Durchmischung des Verdauungsbreies mit körpereigenen Enzymen und z.B. Gallensäften gestört. Das nachfolgende Schema in *Abbildung 10* soll die möglichen Auswirkungen des viskositätssteigernden Effektes der NSP nochmals verdeutlichen:

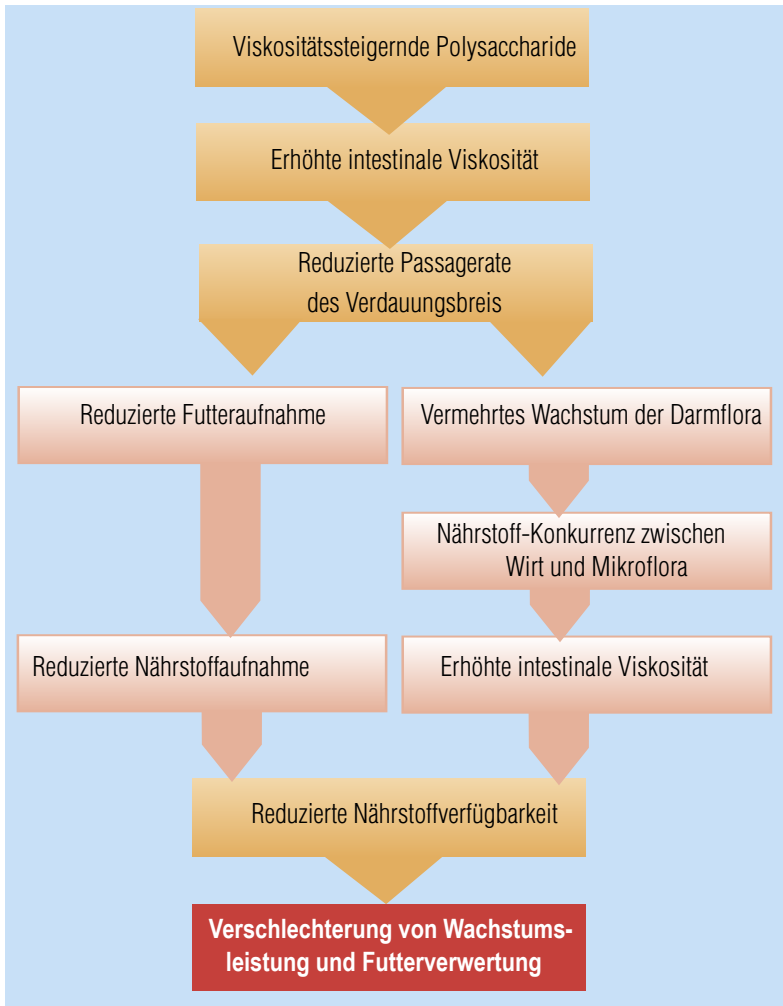
Komplexbildung

Durch Komplexbindungen (z.B. Phytat mit Ca, Mg und Zn sowie Proteinen) werden andere Nähr- und Mineralstoffe gebunden und damit schlechter verdaulich.

Reduzierung der Nährstoffabsorption

Vielfältige Faktoren sind an der durch NSP verursachten Reduzierung der Nährstoffabsorption beteiligt (z.B. Viskosität, veränderte Zusammensetzung der Darmflora, verstärkte Absorption von Gallensäuren, Beeinflussung der Darmmukosa). Dies konnte bisher besonders hinsichtlich der Fettverdaulichkeit beobachtet werden. Darüber hinaus wird durch die verschlechterte Nährstoffabsorption u.U. eine überproportio-

Abbildung 10
Einfluss der
intestinalen
Viskosität



nale Exkretion von Verdauungsenzymen in den Dünndarm verursacht, was zu erhöhten endogenen Eiweißverlusten führen kann.

Dem Einsatzzweck nach können Futterenzy-
me grundsätzlich unterteilt werden in:

a) Enzyme, die körpereigene Verdauungsenzyme monogastrischer Tiere quantitativ ergänzen sollen (z.B. Proteasen, Amylasen, Lipasen)

b) Enzyme, die Monogastrier nicht bilden (z.B. β -Glucanasen, Pentosanasen, α -Galactosidasen, Phytasen)

5. Ziele des Enzymeinsatzes und Wirkungsprinzip

5.1 Ergänzung körpereigener Enzyme

Der Einsatz dieser Enzyme hat die Zielsetzung, eventuell auftretende suboptimale Eigenenzymthesen von landwirtschaftlichen Nutztieren auszugleichen. Hier sind in erster Linie Amylasen und Proteasen zu nennen. Ein Einsatz dieser Enzyme wird vor allem bei jungen Tieren diskutiert, die größere Mengen pflanzlicher Futtermittel aufnehmen.

5.2 Zufuhr von Enzymen, die vom Tier nicht gebildet werden

Von den in der Tierernährung eingesetzten Enzymen, die sich von den im Verdauungstrakt gebildeten unterscheiden, sind folgende Wirkungen bekannt:

Abbau von Inhaltsstoffen, die durch körpereigene Enzyme nicht verdaut werden können, bis zu absorbierbaren Nährstoffen

Dies ist beim Phytinphosphor nachgewiesen, wo durch den Einsatz von Phytase Phosphate freigesetzt werden. Auch verschiedene Oligosaccharide können durch α -Galactosidasen bis zu Glucose und Galactose gespalten und dann absorbiert werden. Im Falle der komplexen NSP sind zu deren vollständigem Abbau eine Vielzahl spezifischer Enzyme notwendig. Die relativ kurze Verweildauer der Digesta und der darin

enthaltenen Enzyme im Verdauungstrakt ist in der Regel für einen vollständigen Abbau der NSP nicht ausreichend. Im Falle der Pentosane (Hauptgruppe der NSP im Getreide) ist ein vollständiger Abbau auch nicht notwendig, da die Spaltprodukte Xylose und Arabinose zwar absorbiert werden, aber auf Grund der ungenügenden intermediären Umsetzbarkeit nur einen geringen Beitrag zur Energieversorgung der Tiere leisten. Allerdings kann die partielle Hydrolyse von NSP-Verbindungen in den vorderen Abschnitten des Verdauungstraktes zu einer verstärkten mikrobiellen Verdauung und Bildung von kurzkettigen Fettsäuren im Enddarm führen.

Senkung der gastrointestinalen Viskosität im Verdauungstrakt

Zur Senkung der Viskosität im Verdauungsbrei ist die Spaltung der löslichen NSP in kleinere Einheiten, die dann die Eigenschaft der Wasserbindung und Quellung verlieren, notwendig. Hierzu sind so genannte Endo-Enzyme, also Enzyme, die innere Bindungen der langkettigen Moleküle angreifen, geeignet. Innerhalb kurzer Zeit können diese Enzyme (Endo- β -Glucanasen, Endo-Xylanasen) die löslichen NSP soweit spalten, dass die viskositätssteigernde Eigenschaft dieser Fraktionen stark verringert wird. Exo-Enzyme, die das Molekül von außen angreifen, brauchen zur Erzielung des gleichen Effektes eine wesentlich längere Einwirkungszeit.

Durch die verringerte Viskosität erfolgt eine bessere Durchmischung des Verdauungsbreis und damit eine erhöhte Wirksamkeit der körpereigenen Enzyme. Damit wird die Nährstoffverdaulichkeit sowie die Umsetzbarkeit der enthaltenen Energie erhöht. Darüber hinaus wird durch die Viskositätssenkung die Passagerate des Nahrungsbreies erhöht sowie die Exkrement- und damit die Einstreubeschaffenheit verbessert in Richtung einer trockeneren und weniger klebrigen Einstreu.

Verringerung des Nährstoff-Ein-schlusses

Hierbei geht es um die Aufspaltung von Zellwandstrukturen, um darin enthaltene Nährstoffe wie z.B. Stärke, Protein und Fette freizulegen und den Verdauungsenzymen zugänglich zu machen. Dazu sind wiederum Endo-Enzyme am besten geeignet, da sie in kurzer Zeit komplexe Strukturen von innen heraus aufbrechen und die Zellwände damit porös machen. Damit kommt es zu einer Beschleunigung der Enzym-Substrat-Kontakte. Diese Endo-Enzyme müssen in erster Linie die unlöslichen, fest in der Zellwand verankerten NSP spalten. Ein vollständiger Abbau ist für diesen Zweck nicht notwendig. Die positive Auswirkung dieses Enzymeffektes beruht also in erster Linie auf einer Verbesserung der Verdaulichkeit der eingeschlossenen Nährstoffe.

Freisetzung anderer Nährstoffe

In den pflanzlichen Zellwänden liegen NSP, Proteine, Phytinsäure und verschiedene Mineralstoffe in komplexen Verbindungen vor. Durch NSP-spaltende Enzyme bzw. Phytasen werden an NSP bzw. Phytat gebundene Nährstoffe freigesetzt, so dass als Begleiteffekt dieser Enzyme die Verdaulichkeit des Proteins und verschiedener Mineralstoffe (Ca, Mg, Zn) verbessert werden kann.

6. Futterenzyme im praktischen Einsatz

6.1 NSP-spaltende Enzyme

Die unter Punkt 5 beschriebenen Wirkungen von NSP-spaltenden Futterenzymen resultieren prinzipiell in einer besseren Verwertbarkeit der im Futter enthaltenen Nährstoffe. Daraus lassen sich zwei verschiedene Einsatzstrategien ableiten.

„On top“-Einsatz

Wird trotz des Enzymeinsatzes mit unveränderten Energie- und Inhaltsstoffwerten (z.B. Proteingehalt) der eingesetzten Rohstoffe als auch der gesamten Ration gerechnet, so stehen dem Tier im Vergleich zu einem Futter ohne Enzymzusatz faktisch mehr Nährstoffe zur Verfügung. Dies resultiert in einer verbesserten Wachstumsleistung. Man spricht hier von „On top“-Einsatz.

„Energy Uplift“-Einsatz

Berücksichtigt man dagegen die durch Enzymzusatz verbesserte Energieverwertung, indem man bestimmte Futtermittel (z.B. Weizen bei Einsatz eines Futterenzym mit Xylanaseaktivität) kalkulatorisch aufwertet, so wird von einem „Energy uplift“ gesprochen. Diese beiden Einsatzstrategien sollen kurz anhand eines Broilerversuches dargestellt werden (*siehe Tabelle 3*) mit vier Versuchsgruppen à 200 Tiere. Gruppe 1 erhielt eine auf Weizen basierende Ration ohne Enzymzusatz, während Gruppe 2 das gleiche Futter, jedoch mit Enzymzusatz erhielt. Gruppe 3 erhielt ebenfalls eine auf Weizen basierende Ration ohne Enzymzusatz; allerdings wurde dem Weizen 6% mehr Energie zugerechnet. Gruppe 4 schließlich erhielt das gleiche Futter wie Gruppe 3, allerdings mit Enzymzusatz. Wie aus *Tabelle 3* ersichtlich, ist Gruppe 2 der Kontrollgruppe (Gruppe 1) in der Mastleistung deutlich überlegen.

Tabelle 3
Einfluss eines Futterenzym auf die Mastleistung und Dünndarmviskosität von Broilern (0-42 Tage)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
«Energy uplift»	Nein	Nein	Ja	Ja
Enzymeinsatz «on top»	Nein	Ja	Nein	Ja
Lebendmassezunahme (g)	2187 ^b	2321 ^a	2130 ^b	2403 ^a
Futerverwertung 1:	1,99 ^b	1,88 ^a	2,01 ^b	1,97 ^b
Dünndarmviskosität (mPa · s)	13,4 ^c	4,2 ^a	10,5 ^{bc}	4,6 ^{ab}

^{a,b,c} Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben in einer Zeile unterscheiden sich statistisch signifikant ($P < 0.05$)

Da Gruppe 1 und Gruppe 2 bis auf den Enzymzusatz mit dem gleichen Futter gefüttert wurden, ist die Leistungssteigerung direkt auf den Enzymeinsatz zurückzuführen. In Gruppe 3 wurde der Weizen mit 6% mehr Energie bewertet, obwohl die Ration kein Enzym enthielt. Aufgrund der energetischen Überbewertung des Weizens hat daher die Ration tatsächlich einen geringeren Energiegehalt, was sich in der schlechteren Mastleistung von Gruppe 3 niederschlägt. Setzt man allerdings nun ein für Weizen geeignetes Futterenzym zu, so wird, wie Gruppe 4 zeigt, die gleiche Futterverwertung wie in Gruppe 1 erreicht.

Während beim Geflügel die viskositäts-senkende Wirkung der NSP-spaltenden Enzyme als ein wesentlicher Hauptwirkungsmechanismus allgemein anerkannt ist, scheint dies beim Schwein nicht so eindeutig der Fall zu sein. Vielmehr wird ein Zusammenspiel der verschiedenen Wirkungsmechanismen (Viskositätssenkung, Aufhebung des Käfigeffektes) diskutiert.

6.1.1 Auswirkungen auf die tierische Leistung

Über die in Kapitel 5 genannten Wirkungen hinaus üben Enzyme einen positiven Effekt auf die tierische Leistung aus. Neben der besseren Verfügbarkeit der Nährstoffe wirken Enzyme durch eine schnellere Passagerate des Verdauungsbreies der Vermehrung von Bakterien, die aus den hinteren Darmabschnitten aufwärts wandern können, entgegen.

Die Verringerung der Viskosität des Verdauungsbreies resultiert zudem in einer verminderten Klebrigkeit sowie einem höheren Trockenmassegehalt des Kotes, was zu trockenerer Einstreu und dadurch zu saubereren Tieren führt. Besonders in der Broiler- und Putenhaltung kommt diesem Effekt aufgrund der üblichen Bodenhaltung auf Einstreu eine wichtige Bedeutung zu, da so das Auftreten von Beinschäden und Brustblasen vermindert werden kann. Bei Legehennen macht sich dieser Effekt durch einen geringeren Schmutzeieranteil bemerkbar.

Im Vergleich zum täglichen Proteinumsatz beträgt die Produktion von körpereigenen Enzymen in den Geweben des Verdauungstraktes etwa 25%. Diese Enzyme sind in der Lage, das bis zu 30-fache der täglichen Nährstoffaufnahme zu verdauen. Nun gibt es Hinweise, dass die Viskositätssenkung auch zu

einer verringerten Ausschüttung von körpereigenen Verdauungsenzymen führt. Diese Vermutung lässt eine Untersuchung an Ferkeln zu, die mit einer auf Gerste basierenden Ration ohne oder mit Enzymsupplementierung gefüttert wurden (Tabelle 4). Obwohl der genaue Regelmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, wird vermutet, dass durch die Viskositätsminderung der Enzym-Substratkontakt erhöht wird. So wären weniger körpereigene Enzyme notwendig, um die gleiche Menge Substrat zu spalten. Die für die endogene Enzymproduktion nicht benötigte Energie steht somit im Sinne eines Energie- und Proteinspareffektes zum Aufbau von Körpermasse zur Verfügung.

Weitere Studien sind zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese notwendig.

6.1.2 Einsatzmöglichkeiten im Mischfutter

Da die NSP-Gehalte nicht nur zwischen den Getreidearten, sondern auch innerhalb einer Getreideart in Abhängigkeit von Standort, Sorte und Erntebedingungen stark variieren, kann durch die Enzymeinmischung eine konstantere Futterqualität erzeugt werden.

Tabelle 4
Einfluss einer β -Glucanase-Supplementierung von gerstereichen Rationen für Ferkel (9-15 kg) auf deren Leistung, die intestinale Viskosität sowie auf die Konzentration von endogenen Verdauungsenzymen

	Kontrollgruppe	Enzym-Gruppe	Signifikanz
tägliche Zunahme (g)	212	219	$p=0,07$
Futterverwertung 1:	1,64	1,59	$p=0,06$
Digestaviskosität im Dünndarm (mPa · s)	3,3	2,2	$p<0,05$
Endogene Enzymkonzentration (mU/g T Verdauungsbrei)			
Trypsin	10,0	5,8	$p<0,05$
Chymotrypsin	0,15	0,11	$p<0,10$
Lipase	95,8	51,4	$p<0,10$
Amylase	866	451	$p<0,05$
Kottrockensubstanz (%)	13,6	14,3	$p<0,05$

Aufgrund der verbesserten Verdaulichkeit der Nährstoffe kann bei gleicher Rationszusammensetzung durch den Einsatz von Enzymen der Futterwert erhöht werden. **Abbildung 11** zeigt die Schwankungsbreite im Energiegehalt von fünf verschiedenen Weizenherkünften sowie den Einfluss der Enzymzulage auf den Energiegehalt. Wie aus der Darstellung ersichtlich ist, bestehen im Gehalt an umsetzbarer Energie zwischen den Weizenherkünften erhebliche Unterschiede. Durch die Enzymzulage wird immer eine höhere Energieausbeute realisiert, die umso größer ist, je niedriger der Ausgangsenergiegehalt war.

Dadurch werden die unter Praxisbedingungen auftretenden Unterschiede verkleinert, was zu einer einheitlicheren Futterqualität führt.

Weiterhin können die Höchstgrenzen für den Einsatz bestimmter Rohstoffe in Mischfuttern angehoben werden, da durch die Enzyme die antinutritiven Eigenschaften verschiedener Futterinhaltsstoffe reduziert werden können. So lassen sich z.B. Rationen mit hohen Gersteanteilen erfolgreich in der Broilerfütterung einsetzen. Insgesamt kann gesagt werden, dass durch den Einsatz von Futterenzymen preiswertere Mischfutter bei gleicher tierischer Leistung produziert werden können.

Abbildung 11
Einfluss NSP-spaltender Enzyme auf den Gehalt an umsetzbarer Energie (ME) fünf verschiedener Weizenherkünfte

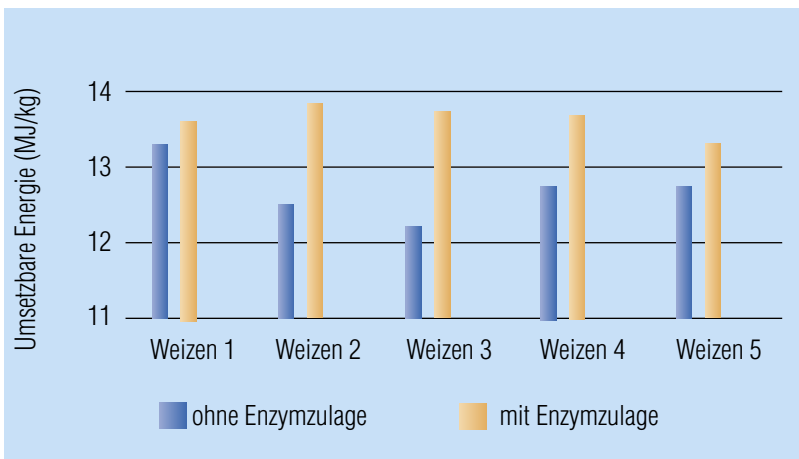


Table 5 enthält Angaben zum möglichen Getreideanteil in Alleinfuttern für verschiedene Geflügelarten bei Verwendung von Futterenzymen.

Ein weiterer Einsatzbereich ist die Verwendung von Futterenzymen in Rationen mit frischerntigem Getreide. Hauptproblem des frischen Getreides ist der im Vergleich zum abgelagerten Getreide hohe Anteil der NSP-Fraktion, der innerhalb der ersten vier bis sechs Lagerwochen durch die im Getreidekorn enthaltenen Enzyme auf ein geringeres Maß reduziert wird. Üblicherweise wird deshalb frischerntiges Getreide in allmählich ansteigenden Anteilen mit abgelagertem Getreide verschnitten, um die Preisvorteile der neuen Ernte auszunutzen. Durch Einmischung von Futterenzymen kann frischerntiges Getreide direkt in höheren Anteilen ohne Leistungseinbußen eingesetzt werden.

6.1.3 Ökonomische Bewertung der Effekte

Der wirtschaftliche Erfolg in der Schweine- und Geflügelmast resultiert im Wesentlichen aus einer hohen Wachstumsleistung, günstiger Futtermittelverwertung sowie der Erfüllung der vom Markt geforderten Schlachtkörpermerkmale. Damit kann der Einsatz von Futterenzymen einen bedeutsamen Beitrag zur Rentabilitätssteigerung leisten. Die Höhe des wirtschaftlichen Effektes hängt allerdings ganz erheblich von den aktuellen Rohstoff- und Mischfutterpreisen sowie den Verkaufserlösen pro Gewichtseinheit ab. Am Beispiel Broilermast werden im Folgenden die prinzipiellen wirtschaftlichen Vorteile des Enzymeinsatzes aufgezeigt.

Table 5
Empfehlungen für Getreideanteile in Alleinfuttermischungen für Hühner ohne bzw. mit Futterenzymzusatz

	Getreideart (% der Ration)									
	Gerste		Hafer		Roggen		Triticale		Weizen	
Enzymzusatz	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Kükenfutter	10	40	20	ad lib.	5	20	20	ad lib.	30	ad lib.
Junghennenfutter	30	ad lib.	30	ad lib.	15	30	30	ad lib.	40	ad lib.
Legehennenfutter	40	ad lib.	20	40	20	40	30	ad lib.	40	ad lib.
Broilerfutter	10	40	20	ad lib.	5	20	20	40	20	ad lib.

ad lib. = ad libitum, ohne Begrenzung

a) Einfluss auf die Futterherstellkosten

In der Broilermast werden energiereiche Futtermittel mit einem Energiegehalt von mindestens 13,4 MJ AME/kg eingesetzt. Weizen und Mais sind die beiden Hauptenergieträger im Broilerfutter. Energie- und Nährstoffgehalte wurden Tabellenwerken entnommen, wobei der Energiegehalt für Weizen mit 12,6 MJ/kg und für Mais mit 13,4 MJ AME/kg angegeben war.

Mittels linearer Optimierung wurden unter Vorgabe der für ein Broilerfutter üblichen Rationsanforderungen ein Futter ohne und ein Futter mit Enzymzusatz formuliert. Im ersten Fall wurden die Tabellenwerte für alle Rohstoffkomponenten verwendet. Die Ration enthielt in diesem Fall 17,5% Weizen und 36,5% Mais. Im zweiten Fall wurde dem Weizen aufgrund eines Enzymzusatzes ein 6% höherer Energiegehalt zugeordnet. Bei Berücksichtigung dieses höheren Energiegehaltes ergab die Rationsberechnung einen Weizenanteil von 54,2%, während kein Mais mehr in die Ration genommen wurde. Nach Abzug der Enzymkosten ergab sich ein Preisvorteil des enzymsupplementierten Futters.

b) Einfluss auf die Erzeugungskosten

Wird dagegen von der Energieanhebung kein Gebrauch gemacht, resultiert die Enzym supplementierung über die oben beschriebenen Wirkungsmechanismen in einer höheren Mastleistung. Bei einem Mastendgewicht von 1,7 kg und einer Verbesserung der Futterverwertung von 1,85 auf 1,76 (-5%) werden pro 1000 Broiler 153 kg Futter weniger benötigt, was einem deutlichen Kostenvorteil entspricht. Da nicht nur die Futterverwertung, sondern auch die Wachstumsleistung (Zunahmen bzw. Mastdauer) durch Enzymzulagen positiv beeinflusst wird, muss in eine vollständige Rentabilitätsberechnung auch der aus der kürzeren Mastdauer resultierende höhere Umtrieb pro Mastplatz mit einfließen.

Diese Zusammenhänge zwischen tierischer Leistung und Rentabilität gelten in ähnlicher Weise auch in der Ferkelaufzucht und Schweinemast. Darüber hinaus können für die verschiedenen Bereiche der Veredelungswirtschaft einzelne Einflussfaktoren des Enzymeinsatzes eine erhebliche wirtschaftliche Bedeutung haben. Zu nennen sind hier u.a. der positive Einfluss einer verbesserten Einstreuqualität auf die Schlachtkörperqualität von Broilern oder der geringere Schmutzeieranteil in der Legehennenhaltung. In der Ferkelaufzucht spielt dagegen

die Einheitlichkeit der Tiergruppen eine erhebliche Rolle bei der Preisfindung.

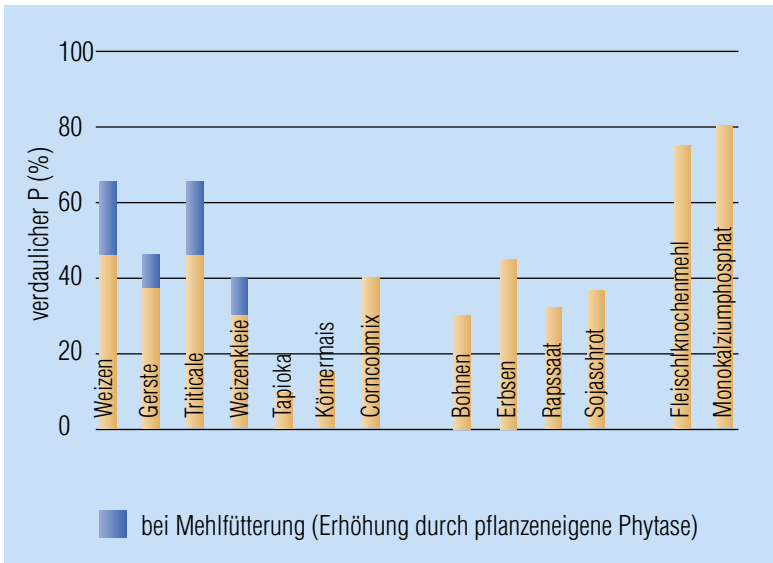
6.2 Phytasen

Der Phosphor aus pflanzlichen Futtermitteln, wie z.B. Getreide und Sojabohnen wird im Vergleich zu anderen P-Quellen von Schwein und Geflügel nur zu geringen Anteilen verwertet (*siehe Abbildung 12*). Dies ist primär darauf zurückzuführen, dass rund zwei Drittel des enthaltenen Gesamtphosphors als Phytatphosphor gebunden vorliegen (*siehe Tabelle 2*).

Diese Phosphorverbindung stellt die Hauptspeicherform für Phosphor in pflanzlichen Samen dar. Sie kann nur durch Phytasen gespalten werden, die

im Magen-Darm-Trakt von Schwein und Geflügel nicht vorkommen. Lediglich in einigen pflanzlichen Futtermitteln, wie z.B. Weizen und Roggen lässt sich eine bestimmte Phytase-Aktivität nachweisen, auf die primär die Unterschiede in der P-Verdaulichkeit verschiedener pflanzlicher Futterkomponenten zurückzuführen sind. Die Wirkung nativer Phytasen kann jedoch bei der Ermittlung des in der Gesamtration enthaltenen verdaulichen bzw. verfügbaren Phosphors nur dann Berücksichtigung finden, wenn das Futter nicht pelletiert oder anderen hydrothermischen Verarbeitungsprozessen unterzogen wird, da diese zur Inaktivierung nativer Phytasen führen. Eine Vorhersage des Einflusses ist schwer möglich, da die native Phytase-Aktivität zudem starken

*Abbildung 12
P-Verdaulichkeit
ausgewählter
Futtermittel beim
Schwein*



Schwankungen unterliegt. Hinzu kommt, dass pflanzliche Phytase bei niedrigeren pH-Werten eine geringere Aktivität als mikrobielle Phytase aufweist (siehe **Abbildung 13**). So ließ sich in P-Verdaulichkeitsstudien beim Schwein nachweisen, dass Phytase aus Weizen nur ca. 55% der Wirksamkeit mikrobieller Phytase besitzt.

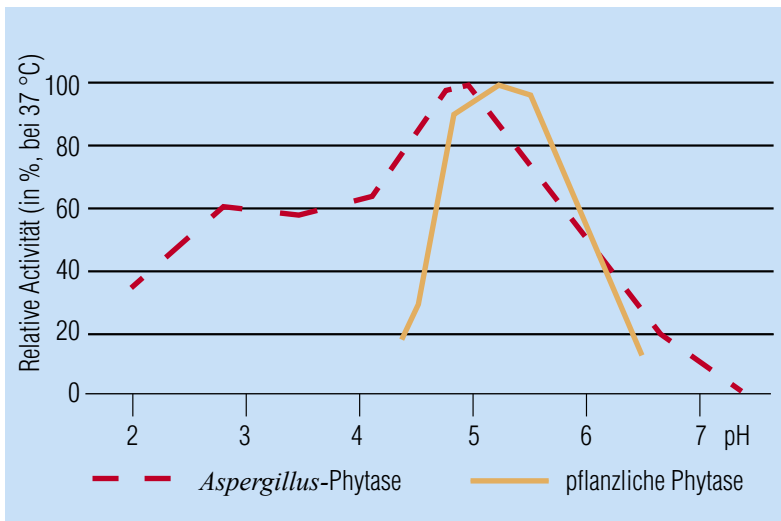
Neben der Bindung von Phosphor übt Phytat bei Schwein und Geflügel aber weitere antinutritive Wirkungen aus, die im Molekülaufbau begründet liegen. So tragen die sechs Phosphatgruppen der Phytinsäure bei vollständiger Dissoziation zwölf negative Ladungen, die im schwach sauren bis neutralen Milieu verschiedene Elemente in festen Komplexen binden und somit deren Verfügbarkeit herabsetzen können. Auch werden Interaktionen zwischen

Phytinsäure und Proteinen beschrieben. So ist im sauren Milieu des Magens bei bestimmten Proteinen ein negativer Einfluss der Phytinsäure auf die Löslichkeit von Proteinen und die Funktion des eiweißabbauenden Enzyms Pepsin zu erwarten.

6.2.1 Wirkungen von Phytase

Die Wirkung mikrobieller Phytase bei Schwein und Geflügel wurde vielfach nachgewiesen. Wie die in **Abbildung 14** zusammengefassten Untersuchungen verschiedener Autoren zeigen, lässt sich die Verdaulichkeit bzw. Verfügbarkeit des Phosphors rein pflanzlicher Rationen bei Schwein und Masthähnchen durch den Zusatz mikrobieller Phytase um maximal 25 bzw. 15 Prozentpunkte erhöhen. Bei beiden Tierspezies konnte der Nachweis geführt werden, dass sich

Abbildung 13
pH-Profil von
mikrobieller
Phytase (aus
Aspergillus)
und pflanzlicher
Phytase (aus
Weizen)



durch den Zusatz von 500 Einheiten mikrobieller Phytaseaktivität zum Futter bis zu 1,15 g Phosphor aus Dicalciumphosphat bzw. 1g Phosphor aus Monocalciumphosphat wirkungsäquivalent substituieren lassen.

6.2.2 Einsatzmöglichkeiten im Mischfutter

Je kg Alleinfutter werden dem Futter je nach Tierspezies, Nutzungsrichtung und zu substituierender Phosphormenge bis zu 600 Einheiten Phytaseaktivität

(Definition siehe Kap. 8.2) zudosiert. Steigende Calcium-Gehalte im Futter üben zwar bei P-Mangeldiäten, nicht jedoch bei praxisüblichen Rationen einen negativen Einfluss auf die Phytasewirkung aus. Dennoch sollten 0,9% Calcium im Broilerfutter möglichst nicht überschritten werden. Bei der Optimierung des Futters für Ferkel, Mastschweine und Sauen empfiehlt es sich, die in **Tabelle 6** aufgeführten Verhältnisse von Calcium : verdaulichem Phosphor einzustellen. Nach bisher vorliegenden Untersuchungen bestehen

Abbildung 14 Einfluss von Phytase auf Verdaulichkeit und Verwertung (in % der Aufnahme) von Phosphor bei Schwein und Geflügel

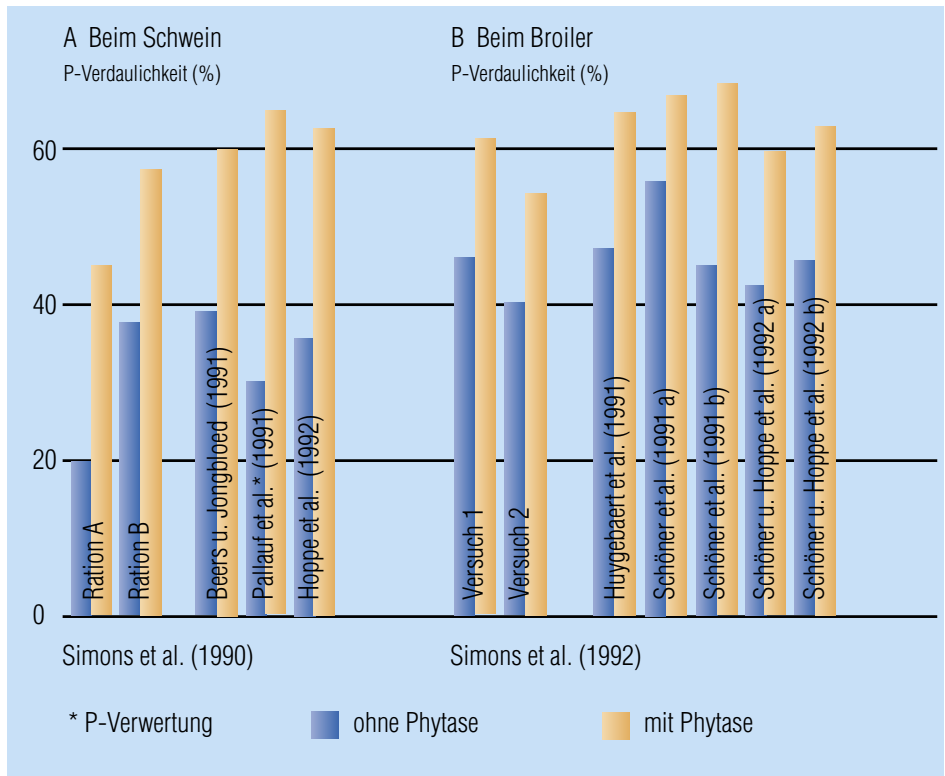


Tabelle 6
Empfehlungen zum Verhältnis von Calcium : verdaulichem Phosphor im Futter für Schweine

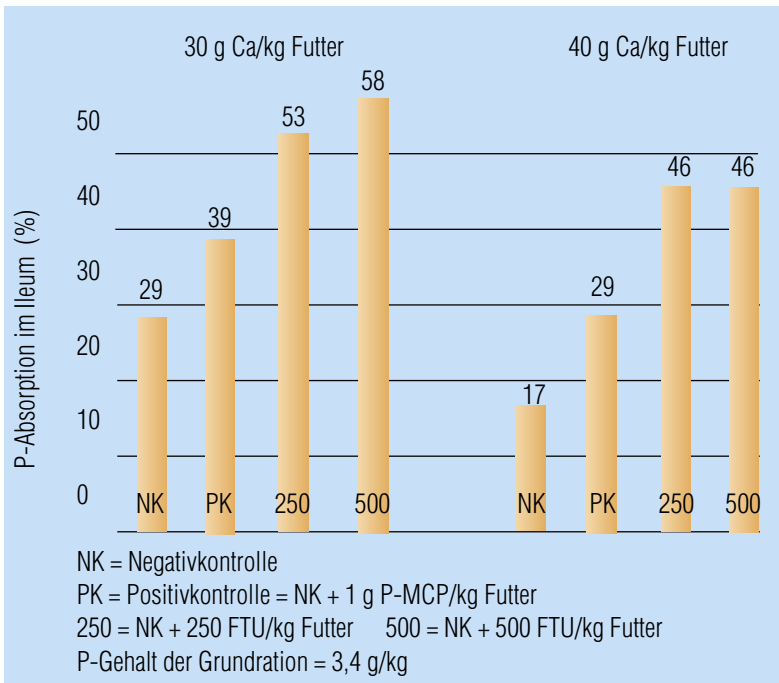
Ferkel	2,5 – 3,0 : 1
Mastschweine	2,7 – 3,5 : 1
Sauen	2,7 – 3,5 : 1

in der Wirksamkeit von Phytase keine altersabhängigen Einflüsse.

Auch bei Legehennen können durch Zulage mikrobieller Phytase die P-Freisetzung aus Phytinsäure deutlich verbessert und mineralische P-Zusätze zum Futter erheblich reduziert werden.

Mikrobielle Phytase ist bei Legehennen noch wirksamer als bei Masthähnchen und Schweinen. Die phytatabbauende Wirkung der Phytase scheint, entgegen der Erwartung, hierbei weitgehend unabhängig vom Ca-Gehalt der Ration zu sein. So üben höhere Calciumgehalte im Futter grundsätzlich einen negativen Einfluss auf die P-Verdaulichkeit aus (siehe *Abbildung 15*). Die durch mikrobielle Phytase verursachte Verbesserung in der P-Verdaulichkeit ist jedoch weitgehend unabhängig vom Ca-Gehalt des Futters.

Abbildung 15
Ileale P-Absorption bei Legehennen



In Abhängigkeit vom Versorgungsni-
veau konnte – primär anhand von Fut-
terungsversuchen bei Schweinen- auch
bei anderen Mengen – (z.B. Calcium
und Magnesium) sowie verschiedenen
Spurenelementen (z.B. Zink) ein positi-
ver Einfluss mikrobieller Phytase auf die
Höhe der Absorptionsrate nachgewiesen
werden. Es ist deshalb sinnvoll, bei
Zusatz mikrobieller Phytase zum Futter
neben einer Reduzierung des P-Gehal-
tes auch die Supplementierungsrate
anderer Mengen- und Spurenelemente
zu überprüfen.

Erste Untersuchungen beim Schwein
zeigen, dass mikrobielle Phytase auch
einen positiven Einfluss auf die Pro-
tein- und Aminosäurenverdaulichkeit
ausüben kann. Diese Daten reichen
jedoch noch nicht aus, um hieraus für
den Einsatz von Phytase zusätzliche
Fütterungsempfehlungen ableiten zu
können.

6.3 Andere Enzyme

Neben NSP-spaltenden Enzymen und
Phytase werden weitere Enzyme als
Futterzusatzstoffe verwendet. Dazu
zählen z.B. Proteasen, Amylasen und
Galactosidasen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass
auch Nährstoffe, für deren Abbau vom
Tier selbst Enzyme produziert werden,
nicht immer optimal verdaut werden.
Diese suboptimale Nährstoffverwertung
lässt sich auf eine unter bestimmten
Bedingungen unzureichende endogene
Enzymproduktion zurückführen. Dies ist
insbesondere bei jungen Tieren sowie
während Phasen der Futterumstellung
der Fall. Hier kann eine Supplementie-
rung mit Amylasen und Proteasen zu
einer verbesserten Nährstoffverwertung
führen.

7. Enzyme und Umwelt

Bei der Umwandlung von mit dem Futter aufgenommenen Nährstoffen, wie z.B. Stickstoff und Phosphor, in tierische Produkte treten selbst unter optimalen Bedingungen bei Schwein und Geflügel relativ hohe Verluste auf.

Zahlreiche Fütterungsmaßnahmen können dazu beitragen, diese Veredlungsverluste zu minimieren und somit die Nährstoffausscheidung mit der Gülle erheblich zu reduzieren. Zu den wirksamsten Maßnahmen gehören eine besser dem Bedarf angepasste Fütterung, der Zusatz reiner Aminosäuren bei gleichzeitiger Absenkung des Rohproteingehaltes im Futter sowie der Einsatz von Futterenzymen.

*Tabelle 7
Reduzierung
der P-Aus-
scheidung
beim Mast-
schwein
durch Einsatz
von Phytase*

	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe (500 FTU Phytase je kg Futter)
Futteraufnahme		
- Vormast (kg)	74.4	76.4
- Endmast (kg)	142.3	142.6
P-Gehalt je kg Futter		
- Vormast (g)	5.5	4.6
- Endmast (g)	4.4	3.4
P-Aufnahme, gesamt (g)	1035	836
P-Ausscheidung je Tier (g)	625	428
Verringerung der P-Ausscheidung durch Phytase-Einsatz (%)		32

Zur Reduzierung der Phosphorausscheidung dürfte der Einsatz von Phytase von größtem Nutzen sein. Aufgrund der Erhöhung Verdaulichkeit bzw. Verfügbarkeit des im Futter enthaltenen Phosphors lässt sich die zur Bedarfsdeckung erforderliche Phosphor-Zulage reduzieren. Beide Faktoren zusammen üben einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Höhe der Phosphor-Ausscheidung aus. Unter praxisüblichen Bedingungen ist beim Einsatz mikrobieller Phytase eine Reduzierung der P-Ausscheidung von im Mittel 30% zu erwarten (*siehe Tabelle 7*). Auch der Einsatz von NSP-abbauenden Enzymen trägt über eine Verbesserung der Futter- und somit Nährstoffausscheidung (N, P etc.) um im Mittel 5% und zu einem höheren Kot-Trockenmassegehalt bei.

Durch den Einsatz von Futterenzymen, insbesondere NSP-spaltenden Enzymen, lässt sich die Futterverwertung verbessern und somit der Nährstoffaufwand je kg erzeugtes Produkt (Fleisch, Eier) deutlich reduzieren. Bei Zulage von NSP-Enzymen sinkt zudem der auf die Futtermenge bezogene Wasserverbrauch. Somit leisten Enzyme einen wesentlichen Beitrag zu einer stärker umwelt- und ressourcenschonenden Tierproduktion.

Die Bestimmung der Enzymaktivität unterscheidet sich von der Analytik anderer Zusatzstoffe für die Tierernährung erheblich. Während bei der chromatographischen Analyse von zum Beispiel Vitaminen die einzelnen, chemisch genau definierten Moleküle nach Art und Menge erfasst werden, reicht dies bei der Quantifizierung von Enzymen nicht aus. Bei Enzymen muss deren Wirkung in Form ihrer Aktivitäten nachgewiesen werden.

8.1 Bestimmung der NSP-Enzymaktivitäten

In der Natur gibt es eine ganze Reihe verschiedener Enzyme, welche die Fähigkeit haben, NSP zu spalten. Betrachtet man jedoch die in der Praxis eingesetzten Futterenzyme, so reduziert sich diese Vielfalt auf einige wenige. Die Messung der Aktivitäten in den Enzympräparaten erfolgt durch Inkubation mit einem geeigneten polymeren Substrat und nachfolgender Erfassung der daraus freigesetzten Spaltprodukte. Als Substrate dienen hierbei z.B. spezifische Xylane oder β -Glucane. Wie bei allen enzymatischen Messmethoden beeinflussen die Temperatur, der pH-Wert, die Inkubationsdauer und das Konzentrationsverhältnis des Enzyms zum Substrat das Resultat in entscheidender Weise. Deshalb müssen die angegebenen Messbedingungen genau eingehalten werden.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten in Futtermitteln bzw. in Vormischungen erfolgt ebenfalls nach dem Prinzip der Messung der aus einem Substrat gespaltenen Moleküle, doch können dazu die reduzierenden Zucker nicht als Messkriterium verwendet werden, da diese in der Futtermittelprobe von Natur aus schon in hohen Konzentrationen vorliegen. Eine alternative Möglichkeit ergibt sich in der Verwendung farbstoffmarkierter Substrate. Diese werden durch die Enzyme in kleinere, löslichere Einheiten gespalten, welche den Farbstoff tragen. Durch einen einfachen Filtrationsschritt werden diese vom unlöslicheren Substrat getrennt und können photometrisch gemessen werden. Ferner gibt es unlösliche chromogene Substrate, bei denen eine Farbstofffreisetzung gemessen werden kann, ohne dass ein Filtrationsschritt erforderlich ist. Da Interaktionen mit Futtermittelkomponenten auftreten können, muss entweder nach der internen Standard-Methode (Zusatz einer bekannten Menge des eingesetzten Enzympräparates) oder mit Hilfe einer Eichkurve mit einem entsprechenden Blindfutter gearbeitet werden.

Ferner bietet sich die Messung der Viskosität an. Das Prinzip der Viskositätsmessung nutzt die enzymatische Fähigkeit, die Viskosität einer Standardsubstratlösung (unter definierten Bedingungen) zu reduzieren. Bei der Aktivitätsmessung wird die Viskositäts-senkung per Zeiteinheit durch Enzymzu-satz ermittelt.

8.2 Bestimmung der Phytase-aktivität

Die Aktivität von Phytase ist, wie bei allen anderen Enzymen auch, im Wesentlichen abhängig von Temperatur, pH-Wert, Substrattyp sowie Substratkonzentration. Bei der Festlegung der Parameter hat man sich eng an den ernährungsphysiologischen Bedingungen orientiert, unter denen Phytase in vivo wirkt. Die Inkubationstemperatur wird auf 37 °C eingestellt und der pH-Wert mittels Pufferzusatz auf 5,5. Als Substrat wird das gut wasserlösliche Natriumphytat gewählt, das auch das natürlich vorkommende Substrat darstellt. Aus dem Wirkprinzip, nämlich der Freisetzung von Phosphat, wurde auch das Messprinzip der Aktivitätsbestimmung, die Analyse von freigesetztem Phosphat abgeleitet. Da das Untersuchungsmaterial üblicherweise bereits Phosphat enthält, ist in jedem Fall eine Differenzmessung erforderlich. Sie erfolgt dergestalt, dass der Phosphat-gehalt einer Probe vor – entspricht dem Probenleerwert – und nach – entspricht

dem Probenwert – einer Inkubationspe-riode gemessen wird. Dies bietet gleich-zeitig den Vorteil, dass probenspezifi-sche Unterschiede kompensiert werden. Die photometrische Bestimmung des Phosphats erfolgt gemäß der offiziellen E.C.-Methode über den gelbgefärbten Molybdato-Vanadat-Komplex. Eine Phytaseeinheit (FTU) ist hierbei definiert als die Enzymaktivität, die unter opti-mierten Bedingungen (pH 5,5, 37 °C) pro Minute aus einem Überschuss an Na-Phytat 1 µmol anorganisches Phos-phat freisetzt.

Für die Ermittlung der Phytaseaktivität in Enzympräparaten, den verschiedenen Vormischungen und Mischfuttern ste-hen zwei VDLUFA-Verbandsmethoden zur Verfügung. Die Referenzmethode wird hauptsächlich zur Validierung und Überprüfung von Phytasestandard- oder Kontrollproben verwendet, wobei die freigesetzte Phosphatmenge über eine externe Phosphatkalibrierkurve ermittelt wird. Die Relativmethode, die in der täglichen Routineanalytik eingesetzt wird, vergleicht die Enzymtätigkeit mit der eines Phytasestandardpräparates mit bekannter Enzymaktivität.

9. Anwendungsformen, Dosierung und Anwendersicherheit bei Enzymprodukten

Enzyme können grundsätzlich in fester oder flüssiger Form in Futtermischungen eingesetzt werden.

Zunächst wurden Enzyme, wie die meisten anderen Futterzusatzstoffe, in Pulverform oder als Granulat in das Futter eingemischt. Aufgrund ihrer guten Eigenschaften hinsichtlich Lagerstabilität und Mischbarkeit haben sich diese Produktformen bei den herkömmlichen Futtermittelherstellungen bestens bewährt. Sie werden vorrangig in Mehlfuttern, aber auch in pelletierten Futtern verwendet. In Abhängigkeit von der Dosierung kann das Enzymprodukt entweder direkt oder über Vormischungen im Mischfutter eingesetzt werden.

In den letzten Jahren werden in einigen Ländern Mischfutter vermehrt bei sehr hohen Temperaturen pelletiert bzw. expandiert. Dies dient hauptsächlich zur Reduzierung mikrobieller Kontaminationen. Dabei besteht jedoch die Gefahr, dass die Enzyme, die als hochmolekulare Proteine relativ empfindliche Substanzen sind, zerstört werden. Basierend auf diesen Überlegungen entwickelte man flüssige Anwendungsformen. Diese Flüssigprodukte werden erst nach der hydrothermischen Behandlung des Futters eingesetzt. D.h., die Flüssigenzyme werden nach dem Pelletier- bzw. Expandierprozess auf das abgekühlte Futter gesprüht.

Hierfür stehen von mehreren Herstellern verschiedene Geräte für eine kontinuierliche oder chargenweise Applikation zur Verfügung. Für besonders empfindliche Enzyme scheint diese Produktform die einzige Anwendungsmöglichkeit zu sein. Da Enzyme unterschiedliche Verträglichkeiten gegenüber hohen Temperaturen aufweisen, sind bei der Verwendung in pelletierten Futtern die vom Hersteller angegebenen produktspezifischen Grenzen bezüglich der jeweiligen maximalen Temperaturtoleranz zu beachten.

Dosierungen

Die Dosierung der Enzymprodukte ist je nach Verdünnungsgrad und Konzentration der jeweiligen Enzymaktivitäten sehr unterschiedlich. Sie bewegt sich in einer Bandbreite von 50 bis 2.000 mg/kg Alleinfutter. Aufgrund der Abhängigkeit der Enzymwirkung vom Substratangebot sind Angaben über Minimaldosierungen nicht notwendig. Auch auf Maximalwerte kann verzichtet werden, da einerseits bei Überdosierung keine Unverträglichkeiten beobachtet werden und andererseits im Verdauungstrakt der Tiere ein normaler proteolytischer Abbau der Enzyme stattfindet.

Generell kann gesagt werden, dass nach Auswahl der jeweils geeigneten Produktform Enzymprodukte bei allen Technologien der Mischfutterproduktion eingesetzt werden können.

Sicherheit für den Anwender

Wie bei vielen anderen körperfremden Proteinen, können beim Kontakt mit dem konzentrierten Enzym allergene Reaktionen auftreten. Deshalb gehört zum Zulassungsverfahren aller Enzymprodukte u.a. die Prüfung der Anwendersicherheit. Diese wird gemäß den üblichen Auflagen zur Registrierung von Futterzusatzstoffen durchgeführt. Sie entspricht dem höchsten Sicherheitsstandard.

Dennoch haben sich die Hersteller dieser Produkte entschieden, zur zusätzlichen Sicherheit für besonders empfindliche Personen, ein Andreaskreuz und die Gefahrenbezeichnung „Gesundheitsschädlich“ sowie die Sätze „Sensibilisierung durch Einatmen möglich“ und je nach Zustand „Staub nicht einatmen“ bzw. „Aerosol nicht einatmen“ als Warnung vor möglichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen auf das Etikett zu drucken, damit entsprechende arbeitshygienische Maßnahmen beim Umgang mit Enzymen eingehalten werden.

Allgemein gilt, dass bei der Anwendung von Enzymprodukten die gleiche Sorgfalt einzuhalten ist, wie sie bei anderen Futterzusatzstoffen üblich ist. Entsprechende Schutzmaßnahmen sind bei der Einarbeitung von Enzymen in Vormischungen und Mischfuttermittel zu treffen.

10. Definition häufig gebrachter Begriffe

Amylasen Enzyme, die den Abbau von Stärke katalysieren. Es wird u.a. zwischen α -Amylase (Abbau von α -glycosidischen Bindungen im Inneren des Stärkemoleküls) und β -Amylase (Abspaltung von Maltoseresten) unterschieden.

Amylose Löslicher, nicht kleisternder, von \rightarrow Amylopektin umhüllter Bestandteil des Stärkekorns. Lineares Polysaccharid aus \rightarrow Glucose-Molekülen, die über α -1,4- und α -1,6-Bindungen verknüpft sind.

Amylopektin Die mit Wasser quellende, kleisternde Hüllsubstanz der Stärkekörner. Verzweigtes \rightarrow Polysaccharid aus \rightarrow Glucose-Molekülen die über α -1,4- und α -1,6-Bindungen verknüpft sind.

Antinutritive Faktoren Den Nährwert von Futterrohstoffen negativ beeinflussende Stoffe/Substanzen, z.B. \rightarrow NSP in Getreide, Trypsininhibitoren in Sojaextraktionsschrot \rightarrow Phytat in pflanzlichen Samen (abgekürzt ANF)

Apoenzym Proteinanteil eines Enzyms. Bildet zusammen mit dem \rightarrow Coenzym das \rightarrow Holoenzym.

Arabinose \rightarrow Pentose. Häufiger Bestandteil der \rightarrow Pentosane.

Aspergillus Pilz-Familie aus der Pilzunterklasse der Ascomyceten

(Schlauchpilze). *Aspergillus (A.) niger* ist eine schwarzsporige Pilzart, die u.a. das Enzym Phytase synthetisiert.

Bacillus subtilis Ubiquitäres, aerobes, stärke-spaltendes und proteolytisches Bakterium (Heubacillus), das Enzyme produziert. Sporen werden auch als Probiotikum für die Besiedlung der Darmflora verwendet.

Carbohydase Oberbegriff für Enzyme, welche die \rightarrow hydrolytische Spaltung von Kohlenhydraten katalysieren (auch: Carbohydratase)

Cellulase Enzym, das die \rightarrow hydrolytische Spaltung von \rightarrow Cellulose katalysiert (β -1,4-glycosidische Bindungen).

Cellulose Langkettiges lineares Kohlenhydrat. Besteht aus \rightarrow Glucose-Molekülen in β -1,4-Bindung. Kommt vermehrt in Zellwänden vor und bewirkt die Stabilität einer Pflanze.

CMC Carboxy-Methyl-Cellulose. Standardisiertes Substrat, das zur Bestimmung der \rightarrow Cellulase-Aktivität verwendet wird.

Coenzym Niedermolekulare, nicht proteinhaltige organische Verbindung, die zusätzlich zum \rightarrow Apoenzym zur Herstellung und Aufrechterhaltung der katalytischen Wirksamkeit benötigt wird.

Bildet zusammen mit → Apoenzym das → Holoenzym.

Emersverfahren Fermentationsverfahren zur Enzymherstellung, bei dem die Mikroorganismen auf der Oberfläche fester oder pastöser Nährmedien mit Oberflächenbelüftung kultiviert werden.

Endosperm Innerer Teil eines Samens. Bei Getreide Stärkeendosperm. Die umschließenden Zellwände enthalten → NSP.

Enzym Protein, das als biologischer Katalysator biochemische Reaktionen beschleunigt.

Enzymaktivität Beschreibt das Vermögen eines Enzymes, eine bestimmte Menge Substrat unter definierten Bedingungen pro Zeiteinheit umzusetzen. Ist von externen Faktoren wie z.B. → Substrat-Konzentration, → pH-Wert oder Temperatur abhängig.

Enzymcocktail Enzymgemisch

Enzymgemisch Enzymprodukt mit mehreren → Enzymaktivitäten, die von verschiedenen Mikroorganismen synthetisiert wurden.

Enzymkomplex Enzymprodukt mit mehreren → Enzymaktivitäten, die von einem Mikroorganismus synthetisiert wurden.

Enzymwirkung Ergebnis einer enzymatisch katalysierten chemischen Reaktion.

Ferment Ältere Bezeichnung für → Enzym (insbesondere für Verdauungsenzyme). Beispiel: Labferment, das zur Gerinnung von Milch bei der Käseherstellung verwendet wird.

Fermentation Prozesse, bei denen durch den aeroben oder anaeroben Stoffwechsel von Mikroorganismen, durch mikrobielle Enzyme, aber auch mit Hilfe von pflanzlichen oder tierischen Zellkulturen, definierte Produkte entstehen.

Galactose Zu → Glucose (Traubenzucker) stereoisomeres Monosaccharid (Aldohexose).

Galactosidasen → Enzyme, die den Abbau von → Galactose enthaltenden → Oligosacchariden katalysieren.

Glucane Langkettige Kohlenhydrate (Polymere von Glucose), die vor allem in Getreidearten (Geste, Hafer, Triticale) vorkommen. → ANF für monogastrische Tiere.

Glucanase → Enzym, das die hydrolytische Spaltung von → Glucanen spezifisch katalysiert (Beispiel 1,3-, 1,4-β-Glucanase).

Glucose → Hexose. Wichtigstes Monosaccharid, das als monomerer Baustein von → Cellulose den größten Anteil der Biomasse auf der Erde darstellt. Kommt auch als Baustein der Stärke und anderer Kohlenhydrate vor.

Hemicellulase Oberbegriff für → Enzyme, welche die → Hydrolyse von → Hemicellulosen katalysieren.

Hemicellulose Gruppe von langkettigen Kohlenhydrat-Molekülen, die die Textur von Pflanzen bilden. Dazu gehören z.B. die → Glucane und → Xylane.

Hexose Zucker, bestehend aus sechs Kohlenstoff-Atomen.

Holoenzym Katalytisch wirksames Enzym bestehend aus → Apoenzym (Proteinanteil) und → Coenzym.

Hydrolasen Enzyme, die Substrate unter Aufnahme von Wasser (hydrolytisch) spalten.

Hydrolyse Spaltung von chemischen Verbindungen unter Aufnahme von Wasser.

IU International Unit (engl.) Internationale Einheit zur Beschreibung von Enzymaktivitäten.

Kohlenhydrate Sammelbezeichnung für die als Naturstoffe weit verbreiteten Polyhydroxy-Aldehyde (Aldosen) und

Polyhydroxy-Ketone (Ketosen). Die Kohlenhydrate stellen mengenmäßig in den meisten Futtermitteln den größten Anteil.

Lipase → Enzym, das die → Hydrolyse von Fetten katalysiert.

ME Metabolizable Energy. Durch den tierischen Stoffwechsel umsetzbare Energie.

Monosaccharid Einfach-Zucker, auch Saccharid. Baustein der → Oligosaccharide und Polysaccharide. Beispiele: → Pentosen (Xylose, Arabinose), → Hexosen (Glucose, Galactose).

NSP Nicht-Stärke-Polysaccharide, auch als Gerüstsubstanzen in Pflanzen (→ Endosperm) vorkommend.

Oligosaccharid Kohlenhydrat aus zwei bis maximal zehn → Monosaccharid-Molekülen. Beispiel: Lactose (Disaccharid), Raffinose (Trisaccharid).

Osmolarität Maß für osmotisch wirksame Konzentration von gelösten Stoffen (z.B. Zucker, Salze). Bestimmung z.B. durch Gefrierpunktniedrigung.

Pentosanase Enzym, katalysiert die → Hydrolyse von → Pentosanen.

Pentosane Langkettige Polysaccharide, die aus Pentosen bestehen. Vor allem im Weizen und Roggen vorkom-

mend. → ANF für monogastrische Tiere.

Pentose Zucker bestehend aus fünf Kohlenstoff-Atomen.

Phosphatase → Hydrolase, die organische Phosphorsäure-Ester unter Freisetzung von Phosphat und Alkohol aufspaltet.

pH-Wert Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration (pondus hydrogenii, lat.) einer Lösung, gibt den Säuregrad an auf einer Skala von pH 0-14; (sauer: pH 0-7, alkalisch: pH 7-14). Faktor, welcher die Aktivität von Enzymen beeinflusst.

Phytase → Enzym, das die hydrolytische Phosphatabspaltung von Phytinsäure zu niederen Inositolphosphat-Estern und anorganischem Phosphat katalysiert. Kommt in Pflanzen natürlich vor. Mikrobielle Phytase wird als Endprodukt einer Fermentation von → *Aspergillus*-Stämmen gewonnen.

Phytate Salze der → Phytinsäure; Phosphorverbindungen, die hauptsächlich in Pflanzen vorkommen und dort ca. 2/3 des Phosphorgehaltes ausmachen. Für Mensch und Tier nur schlecht verdaulich.

Phytinsäure Phosphorsäure-Hexaester vom Zuckeralkohol Inositol (Myo-Inositol hexakis-dihydrogenphosphat).

Natürliches Vorkommen u.a. in pflanzlichen Samen.

Polysaccharid Mehrfachzucker, langkettiges Kohlenhydrat aus mindestens 10 → Monosaccharid-Molekülen z.B. Pentosane, → Cellulose, Stärke.

Protease Enzym, das die → Hydrolyse von Eiweiß katalysiert.

Proteolyse Spaltung von Eiweiß (Proteinen).

Quellung Aufnahme von Wasser durch molekulare Bindung.

Stamm Genetisch, morphologisch und biochemisch einheitliche Unterart (Subspezies) eines Organismus (Bakterium, Hefe, Pilz), der neben anderen Stoffwechselprodukten → Enzyme synthetisiert. Wird in offiziellen Sammlungen hinterlegt, nachdem er exakt beschrieben und definiert ist (→ Systematik).

Submersverfahren Fermentationsverfahren zur Enzymherstellung, bei dem die Mikroorganismen innerhalb eines flüssigen Nährmediums kultiviert werden.

Substrat Substanz, die in einer enzymatisch katalysierten Reaktion zu einem oder mehreren Produkten umgesetzt wird.

Substratspezifität Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Art des Substrates (Schlüssel-Schloss-Prinzip) →

fisch katalysiert (spaltet β -1,4-Bindungen zwischen Xyloseresten).

Systematik Teilgebiet der Biologie, das sich mit der sinnvollen, vergleichenden Ordnung von Organismen aufgrund deren morphologischen und biochemischen Merkmalskombination befasst. Ziel ist eine taxonomische Einteilung der Organismen als Ausdruck abgestufter genetischer Verwandtschaft.

Taxonomie → Systematik.

Trichoderma ssp Pilzfamilie (z.B. *T. viride*, *T. longibrachiatum*) die eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme produzieren.

Viskosität Zähigkeit. Messbare Größe zur Beschreibung der Fließeigenschaft von gasförmigen und flüssigen Stoffen. Verformung dieser Stoffe mit Geschwindigkeit c nach Einwirkung einer Schubspannung (τ) erfolgt nach der Formel: $\tau = f(c)$. Die Viskosität des Darminhalts ist unter anderem vom Anteil wasserlöslicher, quellender → NSP im Futtermittel abhängig.

Xylan Aus → Pentosen bestehendes langkettiges Kohlenhydrat (Polymer der Xylose), das vor allem im Weizen und Roggen vorkommt.

Xylanase Endoenzym, das die hydrolytische Spaltung von Xylan spezi-

