

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 Pelletvorgang	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 Pelletvorgang	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 Pankreinstabilität	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 Pelletierungsvorgang	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	Futtermittelaufnahme	92

4.6.5.2.3	Futterraufwand.....	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	Futterraufnahme und Futterraufwand.....	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
	Selbstständigkeitserklärung.....	142