ENTWICKLUNG UND ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHE BEWERTUNG MIKROBIELLER HYBRID-PHYTASEN

Alexander Metten

Entwicklung und ernährungsphysiologische Bewertung mikrobieller Hybrid-Phytasen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaften

(Dr. sc. agr.)

Fakultät Agrarwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Nutztierwissenschaften

vorgelegt von

Alexander Metten

geboren in Bergisch Gladbach, Deutschland

2023

Die vorliegende Arbeit wurde am 12. Oktober 2022 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung:	21. Februar 2023
Leitung des Kolloquiums:	Prof. Dr. S. Böttinger
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. M. Rodehutscord
Berichterstatter, 2. Prüfer:	Prof. Dr. J. Bongaerts
3. Prüfer:	Prof. Dr. J. Seifert

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis ..... **I**

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

1. Einleitung **1**

2. Literaturübersicht **3**

2.1 Die Phosphorproblematik *3*

2.2 Klassifizierung und Vorkommen von Phytasen *5*
2.2.1 Histidine acid phosphatases 8
2.2.2 Beta propeller phytases 10
2.2.3 Cysteine phosphatases 11
2.2.4 Purple acid phosphatases 12

2.3 Einflussfaktoren und Limitation des Phytatabbaus in Nichtwiederkäuern *13*
2.3.1 Phytasebezogene Faktoren 13
2.3.2 Futterbezogene Faktoren 16
2.3.3 Tierbezogene Faktoren 19

3. Zielsetzung **23**

4. Material und Methoden **24**

4.1 Material *24*
4.1.1 Chemikalien und Lösungen 24
4.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte 26
4.1.3 Primer 29

4.2 Methoden *31*
4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion 31
4.2.2 Gelelektrophorese 32
4.2.3 Golden Gate-Methode 32
4.2.4 Transformation via Elektroporation 33
4.2.5 Isolierung der Plasmid-DNA 35
4.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration 35
4.2.7 Restriktionsanalyse 35
4.2.8 Sequenzierung 36
4.2.9 Proteinaufreinigung 36
4.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration 36
4.2.11 Denaturierende SDS-PAGE 37
4.2.12 FeMo-Assay 37
4.2.13 MolA-Assay 38
4.2.14 Spezifische Aktivität 39
4.2.15 pH-Aktivitätsprofil 39
4.2.16 Pepsinresistenz 40
4.2.17 IT-50-Assay 41
4.2.18 *In vitro*-Modell 41
4.2.19 Einfluss polyvalenter Kationen auf die Phytaseaktivität 44
4.2.20 *In vivo*-Fütterungsversuch an Broilern 44
4.2.21 Schlachtung und Beprobung der Tiere 47
4.2.22 Analyse der Fußproben 48
4.2.23 Mineralstoffanalyse 48

4.2.24 *Myo*-Inositol-Analyse ... 48
4.2.25 Extraktion von Inositolphosphat-Isomeren ... 48
4.2.26 Inositolphosphat-Analytik ... 49
4.2.27 Kalkulation und Statistik ... 50

5 Ergebnisse ... 51

5.1 Biochemische Charakterisierung der Wildtyp-Phytasen ... 51

5.2 Rekombination der Biobricks ... 55

5.3 Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek nach Phytaseaktivität ... 56

5.4 Biochemische Charakterisierung der Hybrid-Phytasen ... 60

5.5 Untersuchung des $InsP_6$-Abbaus in vitro ... 63

5.6 Einfluss polyvalenter Kationen auf die Phytaseaktivität ... 67

5.7 Untersuchung des $InsP_6$-Abbaus in vivo ... 69
5.7.1 Inositolphosphat- und *myo*-Inositol-Konzentrationen im Verdauungstrakt der Broiler ... 69
5.7.2 Praecaecaler $InsP_6$-Abbau sowie Calcium- und Phosphor-Verdaulichkeit ... 72
5.7.3 Wachstumsdaten der Broiler im Tierversuch ... 73

6 Diskussion ... 75

6.1 Die Rekombinationsbibliothek ... 75

6.2 Diskussion der biochemischen Eigenschaften ... 79
6.2.1 Spezifische Aktivität ... 80
6.2.2 pH-Aktivitätsprofil ... 82
6.2.3 Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau ... 83
6.2.4 Toleranz gegenüber hohen Temperaturen ... 84

6.3 $InsP_6$-Abbau in vitro ... 85

6.4 $InsP_6$-Abbau in vivo ... 90

7 Ausblick ... 94

8 Zusammenfassung ... 95

9 Summary ... 98

10 Literaturverzeichnis ... 101

11 Anhang ... 118

12 Danksagung ... 120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phytatgehalt und intrinsische Phytaseaktivität wichtiger Futtermittelbestandteile. 16
Tabelle 2: Benötigte Lösungen und Chemikalien 24
Tabelle 3: Enzyme und zugehörige Puffer 25
Tabelle 4: Medien und Puffer 25
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien 26
Tabelle 6: Kits zur DNA- und Plasmidaufreinigung 26
Tabelle 7: Geräte und Hilfsmittel 27
Tabelle 8: Plasmide und synthetisierte Phytasegene 28
Tabelle 9: Verwendete Primer 29
Tabelle 10: Standard PCR-Programm zur Amplifikation der Biobricks 31
Tabelle 11: Pipettierschema PCR-Ansatz 32
Tabelle 12: Komponenten eines Ansatzes nach der Golden Gate-Methode 33
Tabelle 13: Thermocycler-Programm der Klonierung 33
Tabelle 14: Herstellung der elektrokompetenten *E. coli* 34
Tabelle 15: Komponenten der Restriktionsanalyse 35
Tabelle 16: Verwendete Lösungen und Puffer im FeMo-Assay 38
Tabelle 17: Verwendete Puffer zur Ermittlung des pH-Aktivitätsprofil. 40
Tabelle 18: Verwendete Puffer im Pepsin-Stabilitäts-Assay 41
Tabelle 19: Thermaler Inkubationspuffer IT-50 41
Tabelle 20: Zusammensetzung der Futtermatrices im *in vitro*-Modell (g/kg Futter). 42
Tabelle 21: Einstellen der pH-Werte für das in vitro-Modell. 43
Tabelle 22: Übersicht der Versuchsdiäten im Tierversuch 45
Tabelle 23: Zusammensetzung der experimentellen Versuchsration für den Broilerversuch (g/kg) 46
Tabelle 24: Analyse der experimentellen Versuchsration des Broilerversuches 47
Tabelle 25: Biochemische Charakterisierung der Wildtyp-Phytasen 52
Tabelle 26: Sequenzierungsergebnisse der 15 zufällig ausgewählten Kolonien der transformierten Rekombinationsbibliothek 56
Tabelle 27: Sequenzierungsergebnisse der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek nach aktiven Phytasen bei einem pH-Wert von 5,5. 58
Tabelle 28: Sequenzierungsergebnisse der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek nach aktiven Phytasen bei einem pH-Wert von 3,0. 59
Tabelle 29: Vergleich der biochemischen Eigenschaften von Hybrid- und Wildtyp-Phytasen. 62
Tabelle 30: Phytat-Abbau und Bildung verschiedener Inositolphosphat-Isomere der untersuchten Phytasen *in vitro* unter Verwendung der Futtermatrix F1 (g/kg). 65

Tabelle 31: Phytat-Abbau und Bildung verschiedener Inositolphosphat-Isomere der untersuchten Phytasen *in vitro* unter Verwendung der Futtermatrix F2 (g/kg). 66
Tabelle 32: Auswirkungen der zugesetzten Phytasen auf den Phytat-Abbau und die Bildung von Inositolphosphat-Isomeren in verschiedenen Segmenten des Verdauungstraktes der Broiler (µmol/g TM)..... 71
Tabelle 33: Auswirkungen der supplementierten Phytasen auf die relative praecaecale Calcium- und Phosphor-Verdaulichkeit sowie den praecaecalen $InsP_6$-Abbau in der Digesta der Broiler. 73
Tabelle 34: Effekte der zugesetzten Phytasen auf die Leistungsdaten und den Fußaschegehalt der Broiler..... 74
Tabelle 35: Einfluss verschiedener Mineralstoffverbindungen auf die Phytaseaktivität bei unterschiedlichen pH-Werten dargestellt als Restaktivität in %. 118

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Phytatabbaus durch eine Phytase 5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Inositol-Phosphat-Isomers Ins(1,4,5)P_3 nach der D-Nomenklatur. 7
Abbildung 3: 3D-Strukur einer histidine acid phosphatase aus *Hafnia alvei* dargestellt als Bändermodell (Cartoon) 8
Abbildung 4: Katalytischer Mechanismus der histidine acid phosphatase nach Rigden (2008) 9
Abbildung 5: 3D-Model einer beta propeller phytase aus *Bacillus subtilis* dargestellt als Bändermodell (Cartoon) 10
Abbildung 6: 3D-Modell einer cysteine phosphatase aus *Selenomonas ruminantium* dargestellt als Bändermodell (Cartoon) 11
Abbildung 7: 3D-Modell einer purple acid phosphatase aus Weizen (*Triticum aestivum L.*) als Bändermodell (Cartoon) 13
Abbildung 8: Phytatabbau der Wildtyp-Phytasen bei pH 3,0 und pH 5,5 54
Abbildung 9: Einfluss verschiedener Mineralstoffverbindungen auf die Phytaseaktivität bei unterschiedlichen pH-Werten 68
Abbildung 10: Auswirkungen der supplementierten Phytasen auf die relative praecaecale Calcium- und Phosphor-Verdaulichkeit sowie den praecaecalen InsP_6-Abbau in der Digesta der Broiler 72
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Aufbaus der via PCR synthetisierten Biobricks 76
Abbildung 12: Strukturelle Darstellung einer Hybrid-Phytase angelehnt an die Sequenz der Wildtyp-Phytase aus *Hafnia alvei* dargestellt als Bändermodell (Cartoon). 78

Abkürzungsverzeichnis

ADFI	*Average Daily Feed Intake*
ADG	*Average Daily Gain*
appA	*Acid periplasmic polyphosphatase A*
AS	Aminosäuren
BCA	Bicinchoninsäure
BPP	*β propeller phytase*
BSA	*Bovine serum albumine*
Ca	Calcium
Cl	Chlorid
Cu	Kupfer
ddH_2O	Bi-destilliertes Wasser
F1	Futtermatrix Nr. 1
F2	Futtermatrix Nr. 2
FCR	*Feed conversion ratio*
Fe	Eisen
FeMo	Eisen-Molybdat
FTU	*Phytase Unit*
G:F	*Gain to feed ratio*
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie
GIT	Gastrointestinaltrakt
HAP	*Histidine acid phosphatase*
HPIC	*High Performance Ion Chromatography*
HPLC	*High Performance* L*iquid Chromatography*
$InsP_6$	Phytat *(Myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-Hexakisdihydrogenphosphat)
$InsP_x$	Inositolphosphat-Isomere
LSmeans	*Least squares means*
LOQ	*Limit of Quantification*
MCP	Monocalciumphosphat
Mg	Magnesium
MI	*Myo*-Inositol
Mn	Mangan
n.d.	Nicht detektierbar
Na	Natrium
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharide
P	Phosphor
PAP	*Purple acid phosphatase*
pc	*Praecaecale*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pi	Anorganisches Phosphat
SDS	Natriumlaurylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Ti	Titan
tP	Gesamt-Phosphor
TM	Trockenmasse
WT	Wildtyp

Zn	Zink

1. Einleitung

Vor 125 Jahren wurde in Japan zum ersten Mal ein Enzym isoliert und beschrieben, welches in der Lage war, „Phytin in Phosphorsäure und Inosit zu spalten“. Das neu entdeckte Enzym wurde von den involvierten Wissenschaftlern „Phytase“ genannt (Suzuki et al. 1907). Gut 84 Jahre später wurde die erste kommerziell erhältliche Phytase als Futtermitteladditiv auf den Markt gebracht. Heutzutage enthalten > 90 % der globalen kommerziellen Futtermittel in der Broiler- und Schweinehaltung eine exogene Phytase (Wilcock und Walk 2016). Angetrieben durch ökonomische sowie ökologische Aspekte konnte die Nachfrage von leistungsfähigen Phytasen in den letzten Jahren stetig zunehmen. Im Jahr 2016 lag das globale Marktvolumen für Phytasen bei 350 Mio. €. Für das Jahr 2024 wird ein Anstieg auf 590 Mio. € erwartet (Greiner 2021; Hussain et al. 2021).

Ein großer Impulsgeber für die Phytaseforschung war die Geflügelindustrie mit dem Wechsel von Fischmehl und anderen hochpreisigen Proteinquellen zu günstigeren pflanzlichen Proteinquellen wie beispielsweise Sojabohnenschrot (Rumsey 1993). Seitdem werden pflanzliche Futtermischungen unter anderem mit mineralischem Phosphor (P) angereichert, um den P-Bedarf der Nutztiere adäquat zu decken und somit für ein optimales Wachstum zu sorgen. Dabei verfügen die meisten pflanzlichen Futtermittel bereits über hohe Mengen organischen Phosphats.

Je nach Getreideart sind im Samen bis zu 80 % des P in Form von Phytat gebunden, was von Nichtwiederkäuern aufgrund einer zu geringen Phytaseaktivität nicht effizient abgebaut werden kann (Eeckhout und Paepe 1994). Aus diesem Grund wird der größte Anteil des Phytat-P von den Tieren ungenutzt wieder ausgeschieden, wenn kein Enzym zugesetzt wird. Des Weiteren besitzt das Phytat aufgrund seiner negativen Ladung antinutritive Eigenschaften, indem es wichtige Nährstoffe komplexiert, die so der Absorption im Verdauungstrakt entzogen werden. In erster Linie werden Phytasen daher eingesetzt, um den antinutritiven Phosphatspeicher der Pflanzen abzubauen und so die Nährstoffverfügbarkeit des pflanzlichen P zu erhöhen. Gleichzeitig kann dadurch der Einsatz von Futterphosphaten reduziert werden, wodurch Kosten eingespart werden.

Das mineralische P, welches in Futtermitteln eingesetzt wird, stammt hauptsächlich aus Phosphaterzen, die wiederum als eine global limitierte Ressource gelten. Dennoch kommt es in Gegenden intensiver, industrieller Landwirtschaft oft zu Umweltverschmutzungen durch zu hohe P-Einträge in Gewässer. Durch die Festlegung von Grenzwerten für die Ausbringung von P-Verbindungen auf landwirtschaftlich genutzte Flächen sollen negative Umweltauswirkungen verringert werden. Dieser Wiederspruch legt nahe, dass mehr Nachhaltigkeit bei dem Einsatz von P-Verbindungen in der Lebensmittelproduktion erforderlich ist.

Ein Schlüssel für mehr Nachhaltigkeit bei der Produktion tierischer Proteinquellen ist unter anderem der Einsatz von Phytasen als Futterzusatzstoff. Die Substitution mineralischer P-Verbindungen durch Phytasen ermöglicht die Schonung limitierter Rohphosphate, die Unabhängigkeit gegenüber

steigenden Preisen für P-Verbindungen und die Reduzierung der P-Ausscheidung von Nichtwiederkäuern. Gleichzeitig können negative Umweltauswirkungen durch zu hohe P-Einträge vermieden werden. Da die Bedeutung von Nachhaltigkeit in der Nutztierhaltung, der Umgang mit limitierten Ressourcen und negative Umweltauswirkungen immer mehr an Relevanz gewinnen, wird der Einsatz und Bedarf an optimierten, leistungsfähigen Phytasen weiter steigen. Neben der Entwicklung von neuen, effizienteren Phytasen ist es von entscheidender Bedeutung die Einflussfaktoren auf die Phytaseaktivität und den Phytatabbau im Verdauungstrakt der Tiere besser zu verstehen. Nur so kann der Einsatz von Phytasen weiter optimiert werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Vielzahl neuartiger Hybrid-Phytasen erzeugt, die unter Berücksichtigung von unterschiedlichen Einflussfaktoren auf den Phytatabbau hinsichtlich ihrer Effizienz als Futtermittelenzym systematisch untersucht wurden.

2. Literaturübersicht

2.1 Die Phosphorproblematik

Phosphor ist ein essenzieller Baustein für alle Lebewesen. Er ist fundamentaler Bestandteil von Nukleinsäuren (DNA/RNA) und ist zudem an einer Vielzahl von Stoffwechselreaktionen beteiligt. So sind beispielsweise phosphorylierte Adenosinphosphate wichtige Energieträger auf zellulärer Ebene. In Form von Hydroxylapatit ($Ca_5(PO_4)_3OH$) ist P Bestandteil von Knochen und Zähnen. Jeder lebende Organismus ist daher auf eine kontinuierliche Zufuhr an P angewiesen. Für eine optimale Entwicklung und Wachstum muss der individuelle P Bedarf der jeweiligen Spezies gedeckt sein. Obwohl P ubiquitär vorkommt und das elft häufigste Element der Erde ist, steht nur ein winziger Bruchteil davon dem Menschen zur Nutzung zur Verfügung (Cordell et al. 2009). Der P, den wir als Bestandteil von mineralischem Dünger benötigen, um den hohen Ertrag an Kulturpflanzen zu gewährleisten, wird größtenteils aus Phosphaterzen gewonnen, deren Vorkommen limitiert sind und nur in wenigen Ländern der Welt abgebaut werden (Filippelli 2011; Cordell und White 2014). Gut 90 % der wirtschaftlich abbaubaren P-Vorkommen sind auf nur sechs Staaten der Erde konzentriert. Ungefähr 74 % davon befinden sich alleine in Marokko und der von Marokko kontrollierten westlichen Sahara (Cordell und White 2014; Brownlie et al. 2021; U.S. Geological Survey 2022). Aus diesem Grund sind die meisten Länder der Welt von P-Importen abhängig. Verstärkt wird diese Abhängigkeit durch fehlende Substitutionsmöglichkeiten des P in der Landwirtschaft (Cordell und White 2014). Wegen eines möglichen Versorgungsrisikos, nahm die Europäische Union im Jahr 2014 „Phosphatgestein“ auf die Liste der 20 kritischen Ressourcen auf.

Aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung und dem damit verbundenen steigenden Bedarf an tierischen sowie pflanzlichen Proteinen, steigt ebenfalls der Bedarf an mineralischen P-Quellen. Nach Schätzungen der Vereinten Nationen leben 2050 voraussichtlich 9,7 Milliarden Menschen auf der Erde (United Nations, 2022). Experten gehen daher davon aus, dass sich gegenüber dem Stand von 2013 die Nachfrage für Rohphosphate bis zum Jahr 2050 mehr als verdoppeln wird (Bertau et al. 2017). Wie lange dabei die nicht erneuerbaren Phosphaterz-Vorkommen reichen, wird kontrovers diskutiert. Schätzungen bewegen sich zwischen 50 und 300 Jahren (Cordell et al. 2009; Gilbert 2009; van Vuuren et al. 2010; Walan et al. 2014; Bertau et al. 2017; Kisinyo und Opala 2020). Nach Bertau et al. (2017), ist heutzutage weniger die P-Verfügbarkeit das Problem, sondern die Qualität der Vorkommen. Sicher ist, dass der Aufwand für die P-Gewinnung kontinuierlich steigen wird, lange bevor die P-Reserven aufgebraucht sind. Grund dafür sind die Abnahme der P-Konzentration und Reinheit gut zugänglicher, hochwertiger P-Vorkommen (Cordell et al. 2009; Bertau et al. 2017). Qualitativ minderwertige Rohphosphate müssen aufwendig aufgearbeitet werden, was zusätzliche Kosten für die P-Gewinnung

bedeutet. Eine logische Konsequenz der steigenden Preise für Rohphosphate sind höhere Kosten für Futter- und Lebensmittel.

Obwohl die Reserven an abbaubaren Phosphaterzen begrenzt sind, werden P-Verbindungen in vielen Bereichen der Landwirtschaft und Tierhaltung wenig effizient eingesetzt (Sharpley et al. 2018; Schneider et al. 2019). Ein Beispiel hierfür sind zu hohe Gesamt-Phosphor (tP) Konzentrationen im Futter von Geflügel und Schweinen, welche den Nährstoffbedarf der Tiere übertreffen. Ebenso ist der exzessive Einsatz von Düngemitteln über den Nährstoffbedarf der Pflanzen hinaus problematisch, da dies zu einer P-Akkumulation im Boden führt, was ein erhöhtes Risiko für P-Verluste an Oberflächengewässer darstellt (Sharpley et al. 2002; Cordell et al. 2009). In Deutschland sind bereits viele landwirtschaftlich genutzte Böden mit P hoch- bzw. überversorgt, was unter anderem auf den intensiven Einsatz von Wirtschaftsdüngern tierischer Herkunft zurückzuführen ist (UBA 2015; Olfs 2019). Wenn die im Boden angereicherten Nährstoffe wie P und Stickstoff (N) durch beispielsweise Starkregen in Oberflächengewässer eingetragen werden, kann es zu einer Eutrophierung der betroffenen Gewässer kommen. Die Folgen reichen von Algenblüten, über Sauerstoffarmut, bis hin zu Fischsterben und dem Aufkommen giftiger Blaualgen, die auch dem Menschen gefährlich werden können. Zwei prominente Beispiele sind der *Chesapeake Bay* (USA) und der *Gippsland Lake* (Australien), wo sich durch exzessive P-Einträge Neurotoxin produzierende Dinoflagellaten ausgebreitet hatten (Turner et al. 2007). Aus Gründen des Umweltschutzes und der Schonung wichtiger Ressourcen wurde in der Europäischen Union für das Ausbringen von Mineralien wie N und P auf landwirtschaftlich genutzte Flächen strenge Grenzwerte erhoben (EU-Richtlinie 91/676/EWG).

Der effizientere Einsatz von mineralischen P-Verbindungen in der Haltung von Nichtwiederkäuern, oder ihr Verzicht können dazu beitragen, die P-Gehalte in Wirtschaftsdüngern zu reduzieren, limitierte Ressourcen zu schonen und negative Umweltauswirkungen zu reduzieren. Ein Verzicht auf Monocalciumphosphat (MCP) in der Haltung von Broilern könnte zum Beispiel den jährlichen P-Bedarf um bis zu 1 Mio. Tonnen reduzieren (Dersjant-Li et al. 2020). Dazu ist es notwendig, dass in pflanzlichen Futtermitteln enthaltene P, welches in Form von Phytat gebunden ist, so effizient wie möglich zu nutzen.

Um das Phytat nutzbar zu machen, wurde eine Reihe unterschiedlicher Strategien erprobt. Diese reichen von verschiedenen Methoden der Futter-Vorbehandlung (thermisch, mechanisch etc.), über die Verwendung von „*low phytate grains*“ bis hin zu transgenen Tieren, welche Phytasen in ihren Speicheldrüsen sekretieren (Golovan et al. 2001; Raboy 2001; Denstadli et al. 2006). Die bis heute effizienteste Strategie ist jedoch der Zusatz von mikrobiellen Phytasen in das Futter der Nutztiere (Turner et al. 2007; Babatunde et al. 2021).

2.2 Klassifizierung und Vorkommen von Phytasen

Phytasen repräsentieren eine Untergruppe der Phosphoesterasen und sind in Pflanzen, Mikroorganismen und tierischen Geweben weit verbreitet (Konietzny und Greiner 2002). Per Definition sind Phytasen „*myo*-Inositol-Hexakisphosphat-Phosphohydrolasen“, also Enzyme, die in der Lage sind, die Esterbindungen des Phytats zu spalten und anorganisches Phosphat (Pi) freizusetzen (siehe Abbildung 1). Als Phytat werden die Salze der Phytinsäure (*myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-Hexakisdihydrogenphosphat) kurz $InsP_6$ bezeichnet, welche in der Natur meist mit Kalium (K), Magnesium (Mg) oder Calcium (Ca) assoziiert sind. Phytinsäure bildet den Hauptspeicher für P in Getreide, Hülsenfrüchten sowie Ölsaaten und ist somit die primäre organische P-Quelle in pflanzenbasierten Futtermitteln.

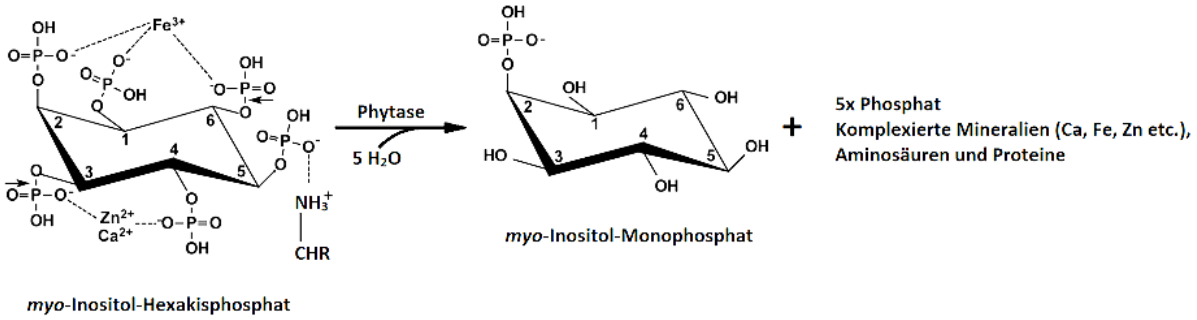

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Phytatabbaus durch eine Phytase.

Neben den Phosphatgruppen können ebenso komplexierte Mineralien, Aminosäuren und Proteine freigesetzt werden. Die Nummerierung der Kohlenstoff-Atome des myo-Inositol-Ringes erfolgte nach der D-Nomenklatur (1-6). Die Pfeile markieren die initiale Hydrolyse einer 3- bzw. 6-Phytase an den Positionen D-3 bzw. D-6. Je nach Substratspezifität und Reaktionsmechanismus sind Phytasen nicht in der Lage das Phytat vollständig zu dephosphorylieren.

Die enzymatische Reaktion der Phytasen ist nicht auf eine der Phosphatgruppen begrenzt, sondern die Hydrolyse erfolgt schrittweise unter der Ausbildung verschiedener, partiell phosphorylierter Inositolphosphat-Isomere ($InsP_x$). Der Abbauweg von $InsP_6$ ist äußerst divers und kann sich zwischen verschiedenen Phytasen deutlich unterscheiden. Inklusive der unterschiedlichen Stereoisomere können 62 $InsP_x$ gebildet werden (Shears and Turner 2007). Grund dafür ist die Stereospezifität der Katalysemechanismen der jeweiligen Phytasen, so dass je nach Phytase unterschiedliche Haupt- und Nebenabbauwege existieren. Abhängig von der Substratspezifität und dem Katalysemechanismus können Phytasen bis zu fünf Phosphatgruppen des $InsP_6$ freisetzen (Menezes-Blackburn et al. 2022). Mit fortschreitender Dephosphorylierung nimmt die Affinität der entstehenden $InsP_x$ zum aktiven Zentrum der Phytase ab. Für Phytasen mit einer hohen Substratspezifität für $InsP_6$ sind niedere $InsP_x$ schlechtere Substrate und können weniger effizient dephosphoryliert werden. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass $InsP_1$-Isomere, wie dem $Ins(2)P_1$, nicht effektiv von Phytasen abgebaut werden können und aus diesem Grund akkumuliert werden (Wyss et al. 1999; Nakano et al. 2000; Greiner und Alminger 2001; Greiner et al. 2007b; Greiner und Konietzny 2010; Menezes-

Blackburn et al. 2022). Unter den anspruchsvollen Bedingungen *in vivo* ist der Phytatabbau meist unvollständig und resultiert daher in der Akkumulation einer Mischung unterschiedlicher $InsP_x$, wie beispielsweise $InsP_5$, $InsP_4$ und $InsP_3$. Die Bildung von *myo*-Inositol (MI) erfolgt *in vivo* meist über endogene mikrobielle- und mukosale Phytasen sowie Phosphatasen (Dersjant-Li et al. 2015).

Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1907 sind bis heute eine Vielzahl an Phytasen bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Struktur, Größe, Herkunft, Stereospezifität und Reaktionsmechanismus voneinander unterscheiden (Menezes-Blackburn et al. 2022). Generell werden Enzyme als Phytasen bezeichnet, wenn sie in der Lage sind, $InsP_6$ zu dephosphorylieren. Nach der „*International Union of Pure and Applied Chemistry*“ und der „*International Union of Biochemistry*“ (IUPAC-IUB) erfolgt die Einteilung unterschiedlicher Phytaseklassen anhand der Stereospezifität ihrer $InsP_6$-Hydrolyse.

Abhängig von der initialen Phosphatgruppe, die abgespalten wird, unterscheidet man zwischen 3-Phytasen (EC.3.1.3.8), 5-Phytasen (EC. 3.1.3.72) und 6-Phytasen (EC. 3.1.3.26). Bis heute wurden ausschließlich exogene 3- und 6-Phytasen in Tierversuchen intensiv untersucht (Greiner und Konietzny 2010). Die 3-Phytasen bevorzugen die Hydrolyse der Phosphatgruppe an der Position D-3 des *myo*-Inositol-Ringes, 6-Phytasen hingegen die Position D-6 (L-4) (siehe Abbildung 2). Wichtig zu erwähnen ist, dass pflanzliche 6-Phytasen das Phosphat an der Position L-6 (D-4) bevorzugt hydrolysieren, mikrobielle 6-Phytasen hingegen an der Position D-6 (L-4). Orientiert man sich an der D-Konfiguration, müssten pflanzliche 6-Phytasen als 4-Phytasen klassifiziert werden (Greiner und Konietzny 2010).

Die initiale Hydrolyse der Phosphatgruppe an Position D-5 ist recht selten und konnte zum Beispiel bei einer Phytase aus Lilienpollen nachgewiesen werden (Barrientos et al. 1994; Mehta et al. 2006). Die Existenz von 2- sowie 1-Phytasen erscheint aufgrund von bereits identifizierten, spezifischen $InsP_x$ plausibel. Bislang konnte jedoch keine 2- oder 1-Phosphatase mit Phytaseaktivität isoliert und charakterisiert werden (Greiner und Konietzny 2010; Outchkourov und Petkov 2019).

Die Nummerierung der Phosphatgruppen nach der D- und L-Nomenklatur ist neben der Klassifizierung der Phytasen ebenfalls wichtig für die genaue Beschreibung und Differenzierung der verschiedenen $InsP_x$, die beim Abbau des $InsP_6$ entstehen können. Die Phosphatgruppen werden analog zu den Kohlenstoffatomen im MI-Ring benannt. Veranschaulicht wurde die D-Nummerierung des MIs durch die schematische Darstellung einer Schildkröte, welche die Sesselkonformation mit einer axialen- und fünf äquatorialen Resten zeigt (siehe Abbildung 2). Die Nummerierung beginnt mit der rechten, vorderen Extremität der Schildkröte und wird entgegen dem Uhrzeigersinn fortgesetzt. Eine ausführliche Beschreibung der Nomenklatur und Terminologie der verschiedenen $InsP_x$, inklusive aller möglichen Stereoisomeren findet sich in dem Buchbeitrag von Shears and Turner (2007).

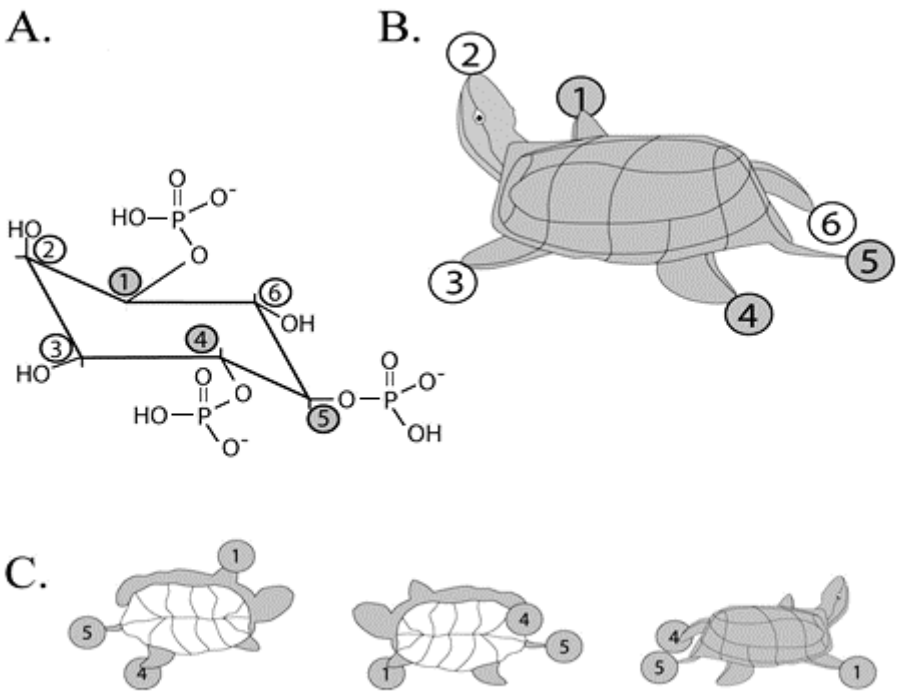

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Inositol-Phosphat-Isomers Ins(1,4,5)P_3 nach der D-Nomenklatur.

A) Ins(1,4,5)P_3-Isomer in der Sesselkonformation. Die Positionen der Phosphatgruppen sind grau markiert. B) und C) zeigen das Isomer in Form einer Schildkröte. Die Darstellung des InsP_3-Isomers erfolgt aus verschiedenen Blickwinkeln und ist abgeleitet nach Agranoff (2009).

Bis heute gibt es keine eindeutige Indikation dafür, dass die initiale Dephosphorylierung der verschiedenen Phytaseklassen die Effizienz des InsP_6-Abbaus *in vivo* beeinflusst. Dafür sind weitere enzymatische Eigenschaften, wie zum Beispiel die spezifische Aktivität, die Substratspezifität, das pH-Aktivitätsprofil und die proteolytische Stabilität im Gastrointestinaltrakt (GIT) zu berücksichtigen, die sich zwischen verschiedenen Phytasen stark unterscheiden können (Greiner und Konietzny 2010).

Neben der Einteilung der Phytasen anhand ihrer initialen InsP_6-Hydrolyse werden Phytasen außerdem über ihren Reaktionsmechanismus klassifiziert. Bis heute unterscheidet man die folgenden 4 Phosphataseklassen mit Phytaseaktivität:

1. *Histidine acid phosphatases*
2. *β-propeller phytases*
3. *Cysteine phosphatases*
4. *Purple acid phosphatases*

2.2.1 Histidine acid phosphatases

Die *histidine acid phosphatases* (HAP) sind die bis heute am besten erforschte Klasse und stellen daher auch die größte Anzahl identifizierter Phytasen dar. Vertreter wurden bereits aus tierischem Gewebe, Pflanzen, Pilzen, Hefen und verschiedenen Bakterien isoliert (van Etten et al. 1991; Greiner et al. 1993; Mullaney et al. 2000; Mullaney and Ullah 2007; Greiner und Konietzny 2010). Wie der Name vermuten lässt, verfügen die HAP über gute katalytische Eigenschaften in einem sauren pH-Bereich. Die Proteinstruktur besteht aus einer konservierten α/β-Domäne und einer variablen α-Domäne (Kostrewa et al. 1999; Lim et al. 2000). An der Schnittstelle beider Domänen befindet sich das hoch konservierte katalytische Zentrum des Enzyms, welches alle HAP teilen. Das aktive Zentrum besteht aus einer N-terminalen RH(G/N)xRxP-Sequenz und einem C-terminalen HD-Motiv, welche bei korrekter Faltung das aktive Zentrum bilden (van Etten et al. 1991; Ostanin et al. 1992; Ullah und Phillippy 1994; Ariza et al. 2013).

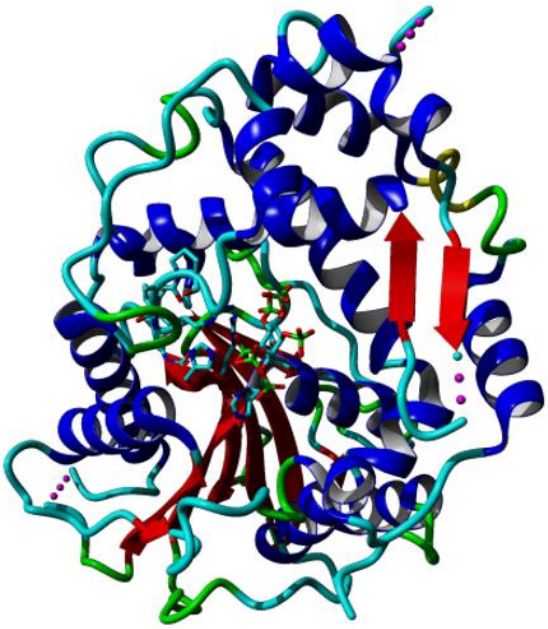

Abbildung 3: 3D-Strukur einer histidine acid phosphatase aus Hafnia alvei dargestellt als Bändermodell (Cartoon).

Die Aminosäurenreste im aktiven Zentrum sind als „sticks“ dargestellt. Ebenso zu sehen ist der Phytase-Inhibitor myo-Inositol-Hexasulfat im aktiven Zentrum (Cyan); α-Helices (Blau); β-Faltblattstrukturen (Rot). Die Struktur wurde mit Hilfe der YASARA-Software erstellt, die PDB-Datei wurde von der Proteindatenbank (RCSB PDB) bezogen: PDB-Code: 4ARO, Chain: A.

Die Hydrolyse der Phosphatgruppen erfolgt in zwei Schritten, ohne dass ein Kofaktor benötigt wird. Zuerst findet ein nukleophiler Angriff, ausgehend vom Histidin (His8) der N-terminalen Sequenz auf das P-Atom einer der Phosphatgruppen statt (siehe Abbildung 4). Es entsteht ein kovalent gebundenes Phosphohistidin-Intermediat. Im zweiten Schritt der Reaktion fungiert die Asparaginsäure (PD) des HD-Motivs als Protonendonor für das Sauerstoffatom der Phosphomonoester-Bindung und das

Intermediat wird unter Verwendung eines H_2O Moleküls hydrolysiert. Das PD muss für diese Reaktion protoniert sein, was das saure pH-Optimum der HAP erklärt (Ostanin et al. 1992; Oh et al. 2004; Rigden 2008; Ariza et al. 2013).

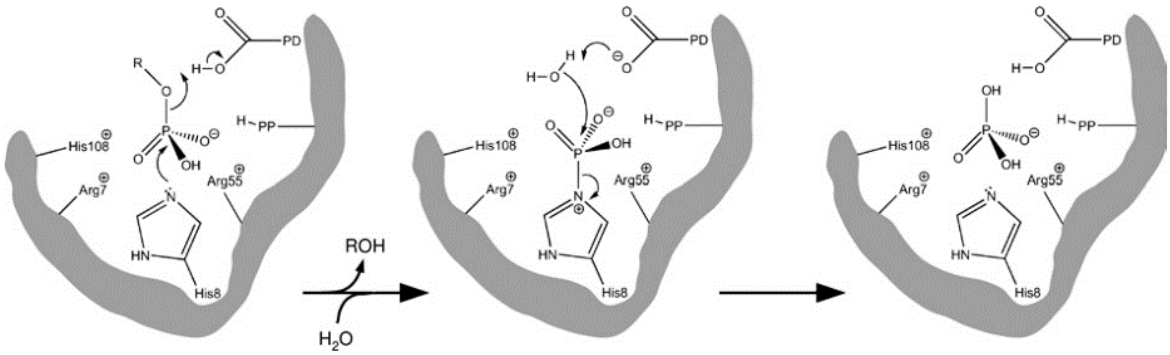

Abbildung 4: Katalytischer Mechanismus der histidine acid phosphatase nach Rigden (2008).

Das His8 ist während der Reaktion phosphoryliert. Die drei Aminosäurenreste Arg7, Arg55 und His108 interagieren während der gesamten Reaktion elektrostatisch mit der Phosphatgruppe und formen so eine Art Phosphattasche. Zusätzlich sind die neutralen oder positiven Aminosäurenreste in der Abbildung als PP dargestellt. Der Protonendonor Aspartat oder Glutamat, je nach Phytase, ist als PD dargestellt.

Trotz des hoch konservierten aktiven Zentrums sind viele HAP nicht in der Lage, das $InsP_6$ effizient zu dephosphorylieren. Die Phytasen aus *Mus musculus* (MIPP) und *Drosophila melanogaster* besitzen zum Beispiel nur eine geringe Phytaseaktivität. Aus diesem Grund sind neben den beiden hoch konservierten Motiven weitere strukturelle Elemente für eine effiziente $InsP_6$-Bindung und Hydrolyse verantwortlich.

Wyss et al. (1999) teilte die HAP aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratspezifität in zwei Untergruppen ein - Phytasen mit einer breiten Substratspezifität (*A. fumigatus, E. nidulans* und *M. thermophila)* und Phytasen mit einer hohen Spezifität für $InsP_6$ (*A. niger, A. terreus* und *E. coli).* Phytasen mit einer breiten Substratspezifität verfügen in der Regel über eine geringe spezifische Aktivität gegenüber $InsP_6$, akzeptierten aber ein breites Spektrum an $InsP_6$-Abbauprodukten. Phytasen mit einer hohen Substratspezifität gegenüber $InsP_6$ verfügen hingegen über eine hohe spezifische Aktivität, dafür können niedere $InsP_x$ in der Regel schlechter dephosphoryliert werden und es kann zu einer Akkumulation von Zwischenprodukten kommen (Wyss et al. 1999; Greiner und Konietzny 2010).

Die erste industriell hergestellte Phytase stammte aus dem Pilz *A. niger* und gehörte zu den HAP. Bis heute zählen alle der zugelassenen, kommerziellen Phytasen zur Gruppe der HAP und sind entweder pilzlichen oder bakteriellen Ursprungs. Das liegt vor allem an den guten biochemischen Eigenschaften. Vorteilhaft ist zum Beispiel eine hohe spezifische Aktivität, die Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau und eine gute Stabilität bei niedrigen pH-Werten, bei denen das $InsP_6$ gut

löslich ist. Außerdem sind HAP Kofaktor-unabhängig, wodurch sie im Vergleich zu anderen Phytaseklassen robuster und unempfindlich gegenüber Oxidationen sind.

2.2.2 Beta propeller phytases

Der Name der *beta propeller phytases* (BPP) leitet sich von der Sekundärstruktur der Enzyme ab, welche hauptsächlich aus β-Faltblattdomänen bestehen, die derart angeordnet sind, dass sie einem Propeller ähneln (siehe Abbildung 5). Die ersten gut erforschten alkalischen Phytasen wurden aus *Bacillus sp*. isoliert und charakterisiert (Ha et al. 2000; Mullaney and Ullah 2007; Lu et al. 2014). BPP katalysieren die Hydrolyse von Ca-Phytat unter alkalischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 7-8. Das aktive Zentrum der BPP besteht aus einer Schneide- und Affinitätsseite, welche je eine benachbarte Phosphatgruppe des $InsP_6$ binden. Aus diesem Grund besitzen BPP eine hohe Substratspezifität und hydrolysieren bevorzugt jede zweite Phosphatgruppe (Shin et al. 2001). Das Endprodukt der Hydrolyse ist stets $InsP_3$. Im Gegensatz zu den HAP wird das $InsP_6$ im aktiven Zentrum der BPP indirekt gebunden. An der Bindung sind mehrere negativ geladene Carboxylat-Reste und fünf Ca^{2+}-Ionen beteiligt. Es wird vermutet, dass die Ca^{2+}-Ionen neben der Hydrolyse auch für die Thermostabilität der Enzyme von Bedeutung sind, da sie an der Bildung von Schleifenformationen beteiligt sind, die das Enzym stabilisieren (Oh et al. 2001; Zeng et al. 2011).

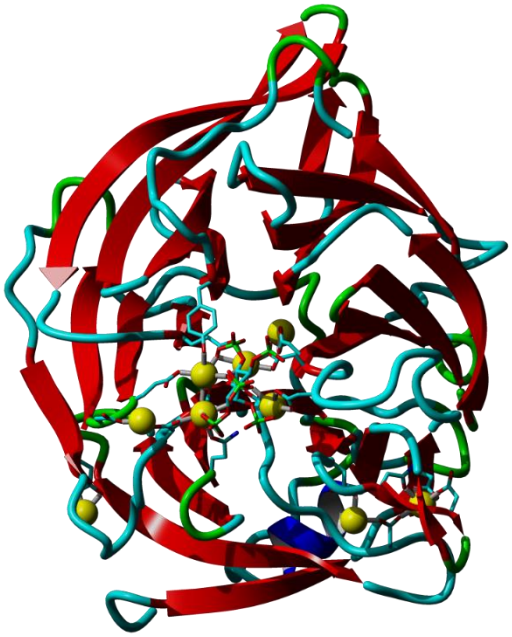

Abbildung 5: 3D-Model einer beta propeller phytase aus Bacillus subtilis dargestellt als Bändermodell (Cartoon).

Die Aminosäurenreste im aktiven Zentrum sind als „sticks“ dargestellt; α-Helices (Blau); β-Faltblattstrukturen (Rot). In Gelb sind die Ca-Ionen zu sehen, die an der Substratbindung beteiligt sind. Die Struktur wurde mit Hilfe der YASARA-Software erstellt, die PDB-Datei wurde von der Proteindatenbank (RCSB PDB) bezogen: PDB-Code: 3AMR, Chain: A.

Im Vergleich zu den HAP besitzen die zurzeit bekannten BPP eine geringe spezifische Aktivität. Hierunter versteht man wie viel µmol Pi eine Phytase pro Minute, bezogen auf ein mg Protein freisetzen kann. Die bis heute höchste spezifische Aktivität wurde bei einer BPP aus *Arthrobotrys oligospora* mit 74,71 U/mg gemessen (Hou et al. 2020). Im Gegensatz hierzu, kommt die bakterielle HAP aus *C. braakii* unter optimalen Bedingungen auf eine Aktivität von 3457 U/mg (Kim et al. 2003).

Das charakteristische neutrale bis alkalische pH-Aktivitätsprofil machen BPP als Zusatz für Futtermittel in Aquakulturen und Anwendungen in der Umwelt interessant (Chen et al. 2015; Kumar et al. 2017; Hou et al. 2020).

2.2.3 Cysteine phosphatases

Die *cysteine phosphatases* (CP), welche über eine Phytaseaktivität verfügen wurden überwiegend aus dem Pansen von Wiederkäuern isoliert. Einer der ersten Vertreter stammte aus dem anaeroben Bakterium *Selenomonas ruminantium* (Yanke et al. 2002; Nakashima et al. 2007). Weitere CP wurden aus *S. lactilytica*, *S. lacticifex* und *M. elsdenii* isoliert (Puhl et al. 2008, 2009). Strukturanalysen ergaben weder Gemeinsamkeiten zu den HAP noch zu den BPP, stattdessen erinnert der Katalysemechanismus an Protein-Tyrosin-Phosphatasen der Cystein-Superfamilie (Abbildung 6).

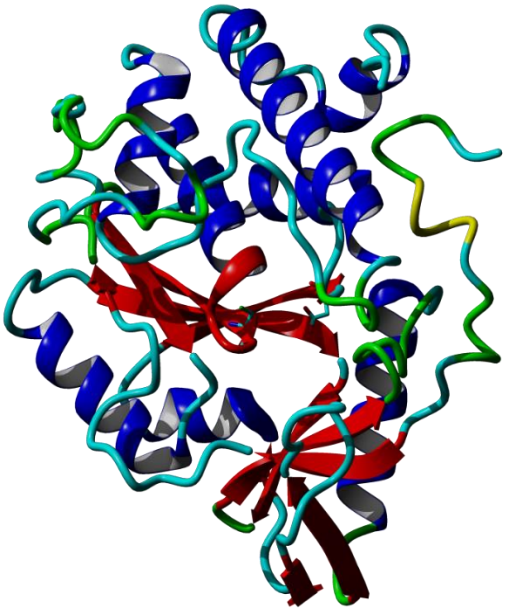

Abbildung 6: 3D-Modell einer cysteine phosphatase aus Selenomonas ruminantium dargestellt als Bändermodell (Cartoon).

Die Aminosäurenreste im aktiven Zentrum sind als „sticks“ dargestellt; α-Helices (Blau); β-Faltblattstrukturen (Rot). Die Struktur wurde mit Hilfe der YASARA-Software erstellt, die PDB-Datei wurde von der Proteindatenbank (RCSB PDB) bezogen: PDB-Code: 1U25, Chain: A, B, C.

Alle CP teilen das hoch konservierte Motiv HCxxGxxR(T/S) im aktiven Zentrum. Das Thiolat des katalytischen Cysteins kann irreversibel oxidiert werden, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Die initiale Bindung des Substrates erfolgt über die negative Ladung des $InsP_6$. Eine Schleife im aktiven Zentrum fungiert als Substratbindetasche, wobei die Größe der Schleife die Substratspezifität für $InsP_6$ definiert (Denu und Dixon 1998; Chu et al. 2004). CP besitzen eine hohe Aktivität bei einem pH-Wert von 4-6. Die Hydrolyse der Phosphatgruppen erfolgt seriell bis $InsP_2$. Die natürlichen Substrate und die biologische Funktion von CP sind bis heute nicht eindeutig geklärt (Huang et al. 2011). Es existieren allerdings einige Studien zum Phytatabbau im Pansen und *in vitro* (Puhl et al. 2008; Weber et al. 2014; Sharma et al. 2018). Außerdem gelang die Produktion einer *Selenomonas ruminantium* Phytase mit einer Grünalge (*Chlamydomonas reinhardtii)* als Produktionswirt (Peraza-Echeverria et al. 2021). Kommerzielle Anwendungen sind bis heute jedoch nicht bekannt.
Der Vollständigkeit halber ist zu erwähnen, dass im Jahr 2019 zum ersten Mal eine Protein-Tyrosin-Phosphatase bei einer Metagenomanalyse in einer Bodenprobe identifiziert wurde, welche in der Lage war, $InsP_6$ als Substrat zu nutzen. Die höchste Substrataffinität bestand allerding zu Naphthylphosphat. Das Enzym besitzt ein aktives Zentrum mit dem Motiv HCxxGKDR(TA)G und lässt sich aus diesem Grund auch den CP zuordnen. Der optimale pH-Wert für die Enzymaktivität liegt bei 5,6. Über ihre Funktion in der Umwelt kann bis heute nur spekuliert werden (Castillo-Villamizar et al. 2019).

2.2.4 Purple acid phosphatases

Die *purple acid phosphatases* (PAP) gehören zu den Metallophosphoesterasen und sind in der Lage Phosphatester und Anhydride unter sauren Bedingungen zu hydrolysieren (Schenk et al. 2013; Rombola et al. 2014). In ihrer oxidierten Form sind PAP in Lösung lila, was der Grund für ihre Namensgebung ist. Die erste binukleare, Metall enthaltene Phosphatase mit Phytaseaktivität wurde in den Keimblättern eines Sojabohnensämlings (*Glycine max* L. Merr.) isoliert (Hegeman und Grabau 2001).Weitere Vertreter finden sich zum Beispiel in Schneckenklee (*Medicago truncatula* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Roggen (*Hordeum vulgare* L.) (Nakano et al. 1999; Xiao et al. 2005; Dionisio et al. 2007). PAP, die in der Lage sind $InsP_6$ zu nutzen, konnten bis heute nur in Angiospermen von Pflanzen identifiziert werden (Mier-Guerra et al. 2021). Die Phytasen spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Keimung. Dabei wird das im Samen gebundene $InsP_6$ hydrolysiert, um Phosphat für das Wachstum der Pflanze freizusetzen.

Alle PAP teilen das charakteristische, binukleare Metallzentrum, welches aus Fe^{3+} und einem der drei Elemente Zink (Zn), Mangan (Mn) oder Mg besteht (Abbildung 7). Für den Ladungsausgleich sorgt ein Tyrosinrest im aktiven Zentrum, der mit den Ionen verbunden ist (Schenk et al. 2013). Dadurch, dass die Enzyme Kofaktoren benötigen, sind sie anfällig gegenüber einer Oxidation. Außerdem fallen die gemessenen Phytaseaktivitäten im Allgemeinen sehr gering aus (Mullaney und Ullah 1998; Liu et al. 2018).

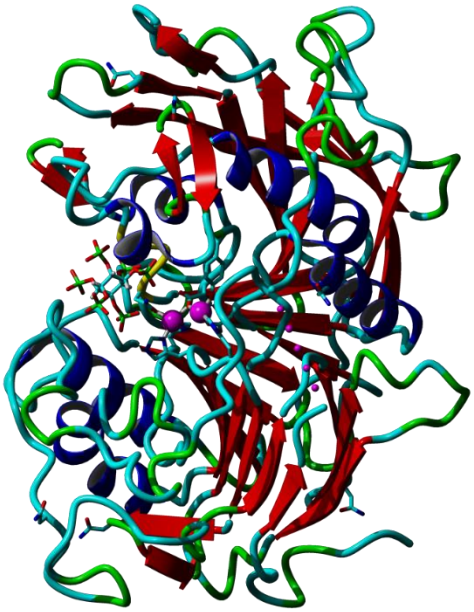

Abbildung 7: 3D-Modell einer purple acid phosphatase aus Weizen (Triticum aestivum L.) als Bändermodell (Cartoon).

Die Aminosäurenreste im aktiven Zentrum sind als „sticks" dargestellt. In Lila sind die beiden Metall-Ionen im aktiven Zentrum zu sehen, welche an der $InsP_6$-Hydrolyse beteiligt sind; α-Helices (Blau); β-Faltblattstrukturen (Rot). Die Struktur wurde mit Hilfe der YASARA-Software erstellt, die PDB-Datei wurde von der Proteindatenbank (RCSB PDB) bezogen: PDB-Code: 3AMR, Chain: A, Isoform B2.

2.3 Einflussfaktoren und Limitation des Phytatabbaus in Nichtwiederkäuern

Aufgrund der Komplexität des Verdauungsprozesses, spezifischer tierbezogener Konditionen und der hohen Variabilität der Futterbestandteile, sind die Auswirkungen auf den $InsP_6$-Abbau *in vivo* nur unzureichend verstanden. Um den Abbau *in vivo* weiter zu optimieren, müssen neben der Verbesserung der biochemischen Eigenschaften der Phytasen die Einflussfaktoren auf den $InsP_6$-Abbau im GIT der Tiere besser verstanden werden. Hierbei wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt. Die hauptsächlichen Einflussfaktoren auf den $InsP_6$-Abbau lassen sich grob in drei Gruppen unterteilen und werden im Folgenden näher erläutert:

1 Phytasebezogene Faktoren

2 Futterbezogene Faktoren

3 Tierbezogene Faktoren

2.3.1 Phytasebezogene Faktoren

Die biochemischen Eigenschaften der Phytasen haben einen maßgeblichen Einfluss auf den $InsP_6$-Abbau im GIT der Nutztiere. Zu den wichtigsten Eigenschaften gehört die Resistenz gegenüber

proteolytischen Enzymen, ein breites pH-Aktivitätsprofil, eine hohe Stabilität bei niedrigen pH-Werten und eine hohe spezifische Aktivität.

Eine hohe Toleranz gegenüber proteolytischen Enzymen im GIT sowie geringen pH-Werten (≤ 3,5) sind entscheidend für einen effizienten $InsP_6$-Abbau *in vivo*, da die Phytasen andernfalls schnell inaktiviert und abgebaut werden können. Eine Pepsin-Resistenz ist von Bedeutung, da es sich um eine saure Protease handelt, die vor allem im Magen der Tiere aktiv ist, wo das $InsP_6$ gut löslich ist und effektiv dephosphoryliert werden kann (Selle et al. 2000; Selle und Ravindran 2007). Die Resistenz gegenüber neutralaktiven Proteasen, wie Trypsin und Chymotrypsin spielt hingegen eine untergeordnete Rolle, da die Aktivität der kommerziell eingesetzten HAP in einem neutralen pH-Bereich stark limitiert ist aufgrund des Reaktionsmechanismus. Zum anderen nimmt die Löslichkeit des Phytats mit steigendem pH-Wert ab (hierzu später mehr) (Rigden 2008; Adeola und Cowieson 2011). Einige bakterielle- und pilzliche Wildtyp (WT)-Phytasen besitzen aufgrund ihres natürlichen Lebensraumes eine hohe Stabilität unter sauren Bedingungen und sind resistent gegenüber Pepsin, wohingegen die meisten pflanzliche Phytasen bei pH-Werten ≤ 3,5 inaktiviert werden und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber gastrointestinalen Proteasen aufweisen (Greiner und Konietzny 2010).

Ein weiterer wichtiger phytasebezogene Faktor ist die spezifische Aktivität. Nach einer offiziell anerkannten Methode ist die spezifische Aktivität definiert als Menge Pi (µmol) die pro Minute aus 5,1 mM Natrium (Na)-Phytat, gelöst in einem 50 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5) von einem mg Enzym freigesetzt wird (AOAC 2000). Üblicherweise wird die Einheit in U/mg Protein angegeben oder als Phytase Unit (FTU) abgekürzt. Je höher die spezifische Aktivität, desto mehr Pi wird unter einer definierten Zeitspanne freigesetzt. Da Phytasen anhand ihrer Aktivität unter Standardbedingungen in das Futter dosiert werden und nicht anhand ihrer Masse, sind die Produktionskosten einer Phytase unmittelbar von der spezifischen Aktivität abhängig.

Die Aktivitäten identifizierter Phytasen sind äußerst divers und reichen von < 10 U/mg (Lilienpollen, Mungbohne, Soja, Mais, *P. simplicissimum*) bis > 1000 U/mg (*C. braakii, C. krusei, P. lycii, Yersinia sp.*) (Huang et al. 2008; Christensen et al. 2020). Pflanzliche Phytasen spielen eine wichtige Rolle beim Keimungsprozess des Samens, besitzen aber häufig eine geringe spezifische Aktivität (Secco et al. 2017). Im Vergleich zu pflanzlichen Phytasen sind mikrobielle Phytasen sehr effizient. Besonders hohe spezifische Aktivitäten zeigen Vertreter der bakteriellen HAP. Hierzu zählen die Phytasen aus *C. braakii* mit 3457 U/mg (Kim et al. 2003), *Yersinia sp*. mit 2344–3960 U/mg (Huang et al., 2008) und *C. krusei* mit 1210 U/mg (Quan et al. 2002). Die pilzliche HAP aus *P. lycii* verfügt ebenfalls über eine hohe spezifische Aktivität von 1080 U/mg (Lassen et al. 2001). Im Vergleich hierzu zeigte die erste kommerziell produzierte Phytase aus dem Pilz *A. niger* eine spezifische Aktivität von 50-133 U/mg (Wyss et al. 1999; Greiner et al. 2009; Greiner und Konietzny 2010). Eine hohe spezifische Aktivität unter Standardbedingungen geht einher mit einer hohen Substratspezifität gegenüber Na-Phytat. Bei der Aktivitätsbestimmung wird jedoch nicht berücksichtigt, wie vollständig das Na-Phytat

dephosphoryliert werden kann und ob es zu einer Akkumulation von Abbauprodukten kommt. Die gebildeten $InsP_x$, die beim $InsP_6$-Abbau entstehen, können zum Beispiel mit einer *High Performance Ion Chromatography* (HPIC), oder *Nuclear Magnetic Resonanz* (NMR) Spektrometrie analysiert werden.

Einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf den $InsP_6$-Abbau stellt der pH-Wert dar, welcher im GIT der Nichtwiederkäuer stark variiert. Aus diesem Grund ist eine hohe Aktivität über einen möglichst breiten pH-Bereich von Vorteil. Die pH-Aktivitätsprofile können sich zwischen verschiedenen Phytasen stark voneinander unterscheiden. Ein gutes Beispiel hierfür sind die Phytasen aus Roggen und *Y. rhodei*. Die pflanzliche- und bakterielle Phytase zeigen bei einem pH-Wert von 5,5 eine vergleichbare relative Aktivität, bezogen auf ihre maximale Aktivität (Greiner und Konietzny 2010). Die pH-Optima der beiden Enzyme unterscheiden sich hingegen deutlich und liegen bei 6,0 (Roggen) und 4,5 (*Y. rhodei)* (Greiner et al. 1998; Greiner et al. 2007a). Während die Phytase aus *Y. rhodei* das $InsP_6$ bei einem niedrigem pH-Wert ($\leq$ 3,5) gut abbauen kann, ist die Phytase aus Roggen hier nahezu inaktiv. Bei einem niedrigen pH-Wert ist das $InsP_6$ zudem gut löslich und kann effektiv dephosphoryliert werden. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Löslichkeit ab und es kommt vermehrt zur Ausbildung von sekundären- und tertiären $InsP_6$-Komplexen mit Mineralien, AS oder Proteinen. Aus diesem Grund kann das $InsP_6$ bei einem pH-Wert von 6,0 *in vivo* weniger effizient abgebaut werden als bei einem sauren pH-Wert (Selle et al. 2000; Tamim et al. 2004; Selle und Ravindran 2007). Da Phytasen standardmäßig auf Basis ihrer Aktivität unter Standardbedingungen (Na-Acetatpuffer, pH 5,5) dem Futter beigemischt werden, wäre der $InsP_6$-Abbau der Phytase aus *Y. rhodei in vivo* deutlich effizienter, auch wenn beide Phytasen mit der gleichen Aktivität (FTU/kg Futtermittel) dosiert werden.

Aufgrund einer besseren Löslichkeit des Substrates ist ein möglichst schneller $InsP_6$-Abbau im oberen Bereich des GITs sehr wichtig, um einen effektiven $InsP_6$-Abbau zu ermöglichen (Yu et al. 2012; Dersjant-Li et al. 2022). Außerdem kann das von den Phytasen freigesetzte Pi nur bis zum terminalen Abschnitt des Ileums absorbiert werden. Danach erfolgt die fermentative $InsP_6$-Hydrolyse in Caecum und Kolon, wobei der Großteil des freigesetzten Pi ungenutzt wieder ausgeschieden wird (Lei und Porres 2007; Dersjant-Li et al. 2015; Humer et al. 2015; Rodehutscord et al. 2022).

Neben den biochemischen Eigenschaften der Phytasen wird der $InsP_6$-Abbau durch die verwendeten Futtermittelbestandteile einer Ration beeinflusst. Aufgrund der Komplexität und Vielfalt unterschiedlicher Futtermatrices, in denen Phytasen eingesetzt werden, existieren eine Reihe an Faktoren, die einen negativen Effekt auf den $InsP_6$-Abbau besitzen.

2.3.2 Futterbezogene Faktoren

Das chemisch synthetisierte Substrat Na-Phytat, das beispielsweise zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt wird, ist nicht die prädominante Form, die in pflanzlichen Rohmaterialien vorkommt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Hydrolyseraten zwischen Na-Phytat und einigen natürlich vorkommenden Salzen der Phytinsäure unterscheidet (Dersjant-Li et al. 2015). Die Zugabe einer *A. niger* Phytase (600 FTU/kg) führte in einem Broilerversuch mit insgesamt 7 unterschiedlichen Rohmaterialien zu einer $InsP_6$-Hydrolyse zwischen 30,8-36,8 % je nach $InsP_6$-Quelle (Leske und Coon 1999). Gründe dafür können Unterschiede in der $InsP_6$-Konzentration, Struktur (z. B. Art der Salze oder Assoziationen mit Proteinen) und der Verfügbarkeit aufgrund der Lokalisierung des $InsP_6$ im Korn sein (Eeckhout und Paepe 1994; Leske und Coon 1999; Selle und Ravindran 2007).

Je nach Rohmaterial sind zwischen 60-80 % des verfügbaren P in den Samen der Pflanzen und daraus gewonnenen Futtermitteln in Form von $InsP_6$ gebunden (siehe Tabelle 1). Die Samen der Getreidekulturen Mais (*Zea mays* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.), Gerste (*Hordeum vulgare* L.) oder Reis (*Oryza sativa* L.) enthalten zwischen 3,0-4,0 mg P/g bezogen auf die Trockenmasse (TM). Leguminosen wie Soja (*Glycine max* L.) besitzen in der Regel höhere Konzentrationen zwischen 6,0-8,0 mg P/g TM. Niedere $InsP_x$ (hauptsächlich $InsP_5$) machen weniger als 10 % der tP Konzentration aus und Pi etwa 5±3 % (Lott et al. 2000; Raboy 2007). Die $InsP_6$-Konzentration im Futtermittel ist eine wichtige Eigenschaft und muss für einen optimalen Phytaseeinsatz bekannt sein, da das Enzym:Substrat-Verhältnis den $InsP_6$-Abbau unmittelbar beeinflusst (Dersjant-Li et al. 2015).

Tabelle 1: Phytatgehalt und intrinsische Phytaseaktivität wichtiger Futtermittelbestandteile.

Futterbestandteil	tP	$InsP_6$-P	$InsP_6$-P/tP	Phytaseaktivität
	g/kg	g/kg	%	FTU/kg
Mais	2,4-2,6	1,7-2,1	72,0-85,4	24-25
Sojaextraktionsschrot	6,5-6,7	3,9-4,5	60,0-68,0	10-95
Soja	5,6	3,1	55,5	40
Weizen	2,0-3,1	1,6-2,2	72,0-80,0	255-840
Gerste	2,6-3,2	1,7-2,0	61,0-67,0	130-595
Rapsextraktionsschrot	8,8	6,5-7,4	66,0-76,4	5-35
Rapsmehl	11,8	7,0	59,0	-
Weizenkleie	11,0	8,4	76,3	1700-3090
Weizengrießkleie	8,5	7,8	92,0	2500
Sonnenblumenmehl	9,1	7,5-7,7	82,8-85,0	< 10

Dargestellt sind die Gesamt-Phosphor (tP) und Phytat-Phosphor ($InsP_6$-P) Konzentrationen in g/kg Futter, sowie das Verhältnis von Phytat- zur Gesamt-Phosphor Konzentration der aufgeführten Futterbestandteile in %. Die rechte Spalte zeigt die Phytaseaktivität der jeweiligen Futterbestandteile in Phytase-Unit (FTU) pro kg Futter. Daten nach Eeckhout und Paepe (1994) sowie Dersjant-Li et al. (2015).

Neben der $InsP_6$-P Konzentration wird das Enzym:Substrat-Verhältnis auch über die Zugänglichkeit und Verfügbarkeit des Substrates für die Phytase beeinflusst. Die Substratverfügbarkeit hängt unter anderem mit der Lokalisation des $InsP_6$ im Samen zusammen. $InsP_6$ wird oft in Form von Globoiden in den Vakuolen der Pflanzenzellen gespeichert. In Mais befinden sich > 80 % des $InsP_6$ im Keim, der Rest wird im Aleuron gespeichert. Bei Weizen, Reis und Gerste hingegen ist es genau umgekehrt. Mehr als 80 % des $InsP_6$ ist in der äußeren Aleuronschicht lokalisiert, der Rest befindet sich im Keim (O´Dell et al. 1972). Bei Soja gibt es hingegen keine spezifische Lokalisierung des $InsP_6$. Hier ist es im Keim und im Keimblattgewebe verteilt, welche zusammen 90 % des Samens ausmachen (Prattley und Stanley 1982; Sebastian et al. 1998; Raboy 2007).

Eine geringere $InsP_6$-P Verdaulichkeit von Raps und Weizen im Vergleich zu Mais und Soja konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden (Leske und Coon 1999; Cheng und Hardy 2002; Blaabjerg et al. 2010a; David et al. 2021). Ein *in vitro*-Versuch mit Rapsmehl zeigte zum Beispiel, dass ein Teil des $InsP_6$ auch nach langen Inkubationszeiten resistent vor der Hydrolyse durch eine exogene Phytase war (Newkirk und Classen 1998). Ein ähnliches Ergebnis zeigten Versuche mit Weizen (Blaabjerg et al. 2010a). Eine mögliche Begründung dafür ist, dass $InsP_6$ in der Aleuronschicht weniger gut verfügbar ist als $InsP_6$, welches sich im Keim befindet. Die Aleuronschicht kann schlechter aufgeschlossen werden als die Zellwände im Endosperm, da sie über dickere Zellwände verfügt (Paloheimo et al. 2010). Aus diesem Grund könnten Futtervorbehandlungen oder Futteradditive, wie Xylanasen oder Glucosidasen einen positiven Effekt auf die Substratverfügbarkeit und somit auf den $InsP_6$-Abbau besitzen. Kombinatorische Effekte zwischen Phytasen und Xylanasen konnten in einigen Tierversuchen gezeigt werden, in anderen wiederum nicht (Olukosi et al. 2010; Karimi et al. 2013; Olukosi et al. 2020). Das liegt daran, dass die Beobachtungen untrennbar mit dem Nährstoffprofil der Diäten, den verwendeten Enzymen, dem Versuchsdesign oder einer Kombination aus den genannten Faktoren verbunden sind (Cowieson 2010).

Neben der Lokalisierung des $InsP_6$ im Rohmaterial kann die Verfügbarkeit ebenso durch die Assoziation mit anderen Molekülen beeinträchtigt werden. Der antinutritive Charakter von $InsP_6$ basiert auf den negativen Ladungen der Phosphatgruppen. Aus diesem Grund besitzt $InsP_6$ ein hohes Potential, primär positiv geladene Moleküle und Nährstoffe zu komplexieren. Auch bei geringen pH-Werten zwischen 2-3 ist das $InsP_6$-Molekül nach außen hin negativ geladen. Grund dafür sind die pK_a Werte von 6 der 12 ionisierbaren Orthophosphaten, da sie zu gering sind um vollständig protoniert zu werden (Adeola und Cowieson 2011). Mit steigendem pH-Wert nimmt der Anteil negativer Ladungen im Molekül zu und somit auch das Potential, positiv geladene Moleküle zu komplexieren. Je höher der pH-Wert ist, desto geringer ist die Löslichkeit von $InsP_6$. Gleichzeitig kann das $InsP_6$ nicht mehr effektiv dephosphoryliert werden (Angel et al. 2002; Adeola und Cowieson 2011).

Je nach Nährstoffbedürfnis der Tiere sind die Mineralstoffkonzentrationen im Futter unterschiedlich hoch. Neben P, machen Ca und Na den größten prozentualen Anteil in einer herkömmlichen Ration aus. Während Komplexe zwischen monovalenten Kationen und $InsP_6$ in der Regel gut löslich sind, werden unlösliche $InsP_6$-Komplexe vor allem durch Bindung von divalenten Kationen, Aminosäuren (AS) oder Proteinen gebildet. Aus diesem Grund spielen unlösliche Ca-Phytat-Komplexe *in vivo* eine große Rolle. Je nach pH-Wert ist ein $InsP_6$-Molekül in der Lage bis zu 6 Ca^{2+}-Ionen zu binden (Selle et al. 2009). Die negativen Auswirkungen hoher Ca-Konzentrationen auf den $InsP_6$-Abbau konnten bereits in einer Reihe von *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen nachgewiesen werden. Eine detailliertes Review existiert von Selle et al. (2009).

In einem Broilerversuch konnte durch die schrittweise Erhöhung der Ca-Konzentration (4,7-11,6 g/kg) eine kontinuierliche Reduzierung der praecaecalen (pc) $InsP_6$-P-Verdaulichkeit bis zu 71 % gezeigt werden (Plumstead et al. 2008). Des Weiteren konnte ein negativer Einfluss auf den pc $InsP_6$-Abbau durch unterschiedliche MCP-Konzentrationen nachgewiesen werden (Shastak et al. 2014; Zeller et al. 2015; Sommerfeld et al. 2018; Papp et al. 2022). Die negativen Auswirkungen auf den $InsP_6$-Abbau *in vivo* konnten hauptsächlich durch die Ausbildung von Ca-Phytat-Komplexen und einer reduzierten endogenen Phytase- sowie Phosphataseaktivität erklärt werden (Tamim und Angel 2003; Tamim et al. 2004; Sommerfeld et al. 2019).

Auch wenn andere Mineralien gegenüber Ca mengenmäßig eine untergeordnete Rolle spielen, können diese ebenfalls unlösliche $InsP_6$-Komplexe bilden. Die Affinität einiger divalenter Kationen zu $InsP_6$ sowie die Stabilität der ausgebildeten Komplexe sind teilweise stärker als mit Ca (Vohra et al. 1965; Maenz et al. 1999). Bei einem neutralen pH-Wert besitzen nach Maenz et al. (1999) Zn^{2+}-Ionen die höchste Affinität zu $InsP_6$. Es folgen in abnehmender Reihenfolge $Fe^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{3+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$. Von Zn wurde die geringste Konzentration benötigt, um die Pi-Freisetzung einer Phytase in einem *in vitro*-Versuch um 50 % zu reduzieren. Mg hatte hingegen den geringsten Effekt auf den Phytatabbau. Die Affinität von Fe zu Phytat nahm bei sauren pH-Werten zu. Ein negativer Einfluss auf den $InsP_6$-Abbau durch hohe Zn-Konzentrationen konnte ebenfalls *in vivo* nachgewiesen werden (Augspurger et al. 2004).

Wichtig zu erwähnen ist, dass die komplexbildenden Fähigkeiten von $InsP_6$ mit fortschreitender Dephosphorylierung abnehmen, da die negative Ladung des Moleküls reduziert wird. In einer Studie mit Fe^{3+} konnte gezeigt werden, dass die Bindekapazität von $InsP_6$ zu $InsP_3$ proportional abnimmt (Yu et al. 2012). Nach Adeola und Cowieson (2011) besitzt $InsP_3$ schätzungsweise 11 % der Bindekapazität von $InsP_6$. Eine möglichst schnelle Dephosphorylierung des $InsP_6$ bis $InsP_3$ im oberen Bereich des GIT würde daher die Ausbildung von unlöslichen $InsP_6$-Komplexen im Ileum bei hohen pH-Werten reduzieren (Dersjant-Li et al. 2015).

Neben der Ca-Konzentration und dem Ca:P-Verhältnis kann der $InsP_6$-Abbau auch durch die Ca-Quelle beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass kleine Partikelgrößen von $CaCO_3$ aufgrund

einer höheren Löslichkeit die Ausbildung von Ca-Phytat-Komplexen erhöhte (Manangi und Coon 2007). Außerdem besitzt $CaCO_3$ eine hohe Bindekapazität für Säuren und ist somit in der Lage den pH-Wert im Verdauungstrakt der Tiere zu erhöhen (Lawlor et al. 2005; Selle et al. 2009). Der pH-Wert wiederum, beeinflusst die exogene- und endogene Phytaseaktivität, die Löslichkeit von $InsP_6$ und die Mikrobiota im GIT der Nichtwiederkäuer (Krieg et al. 2021; Siegert et al. 2021).

Ein weiterer Einflussfaktor auf den $InsP_6$-Abbau stellt die intrinsische Phytaseaktivität dar, die sich abhängig von der Spezies und dem Genotyp der Pflanze stark unterscheiden kann (Rodehutscord et al. 2016). Eine vergleichsweise hohe intrinsische Phytaseaktivität konnte in Roggen (4177 U/kg TM), Triticale (2154 U/kg TM) und Weizen (1850 U/kg TM) nachgewiesen werden (Rodehutscord et al. 2016). In pflanzlichen Beiprodukten, wie Weizenkleie konnten Phytaseaktivitäten bis zu 5345 U/kg TM gemessen werden, was für eine hohe Lokalisierung der Phytase in der Aleuronschicht spricht (Fretzdorff und Weipert 1986; Steiner et al. 2007). Eine sehr geringe intrinsische Phytaseaktivität zeigten hingegen Mais (0-46 U/kg), Hafer (0-108 U/kg), Hirse (0-76 U/kg) und Soja (0-120 U/kg) (Eckhout und De Paepe, 1994). Der Einfluss intrinsischer Phytaseaktivität auf den $InsP_6$-Abbau *in vivo* ist jedoch limitiert. Zum einen kann sie durch die Futtervorbehandlung, wie der Pelletierung stark reduziert werden. Zum anderen sind pflanzliche Phytasen anfällig gegenüber proteolytischen Enzymen und instabil bei niedrigen pH-Werten und können im Magen inaktiviert werden. Während *in vitro*-Versuche einen Einfluss intrinsischer Phytaseaktivität auf den $InsP_6$-Abbau nachweisen konnten, zeigten Tierversuche teils konträre Ergebnisse (Shastak et al. 2014; Zeller et al. 2016; Scholey et al. 2017; Papp et al. 2022).

Letzten Endes wird der $InsP_6$-Abbau durch ein Zusammenspiel aus einer Vielzahl unterschiedlicher futterbezogener Faktoren beeinflusst. So ist die Herkunft, Konzentration, Lokalisierung und Verfügbarkeit des $InsP_6$ entscheidend für die Effizienz des Abbaus. Die Substratverfügbarkeit kann durch den pH-Wert sowie Assoziation mit positiv geladenen Futtermittelbestandteilen negativ beeinflusst werden. Außerdem können die Futterbestandteile auch Auswirkungen auf die Bedingungen im GIT der Tiere haben und beispielsweise den pH-Wert, die Zusammensetzung der Mikrobiota, oder die Expression endogener Enzyme beeinflussen, womit wir zu den tierbezogenen Faktoren kommen.

2.3.3 Tierbezogene Faktoren

Der $InsP_6$-Abbau wird neben den biochemischen Eigenschaften der Phytasen und den Futtermittelbestandteilen ebenfalls stark durch die jeweiligen physiologischen Bedingungen im GIT der Nichtwiederkäuer und endogener mukosaler sowie mikrobieller Phytase- und Phosphataseaktivität beeinflusst. Aus diesem Grund können sich die Reaktionsbedingungen für Phytasen je nach Spezies stark voneinander unterscheiden.

Phytasen werden hauptsächlich in Geflügel- und Schweinefutter eingesetzt, sind aber auch zunehmend in Fischfutter enthalten, da immer mehr Fischmehl durch den Einsatz von pflanzlichen Proteinen ersetzt wird (Kumar et al. 2012; Morales et al. 2016). Die Anforderungen an Phytasen für den Einsatz in Aquakulturen unterscheiden sich aufgrund der Anatomie und den physiologischen Bedingungen im GIT grundlegend von denen in Geflügel und Schweinen. Aus diesem Grund ist die Kompatibilität kommerziell erhältlicher Phytasen für einige Fischspezies heutzutage noch begrenzt. Nichtsdestotrotz konnte bereits in einigen Studien eine verbesserte P-Verdaulichkeit in Fischen durch den Einsatz von Phytasen nachgewiesen werden (Morales et al. 2016; Lemos und Tacon 2017; Greiling et al. 2019). Aufgrund der großen Unterschiede und geringen Relevanz für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, werden die Bedingungen und Einflussfaktoren auf den $InsP_6$-Abbau in Fischen nicht näher erläutert.

Die Anatomie des GIT beeinflusst den $InsP_6$-Abbau, da sie unter anderem die Retentionszeit der *Digesta* bestimmt. Zu weiteren tierbezogenen Faktoren gehört die Viskosität der *Digesta*, die Sekretion von HCl und Verdauungsenzymen, der pH-Wert in den verschiedenen Segmenten des GIT, die Mikrobiota, die endogene Phytase- und Phosphataseaktivität sowie das Geschlecht, Alter und die Wachstumsgeschwindigkeit der Tiere (Dersjant-Li et al. 2015).

Im Vergleich zu Schweinen besitzen Broiler ein hohes biologisches Potential, das $InsP_6$ bis zum terminalen Ileum abzubauen und das freigesetzte Pi zu nutzen. So zeigten Broiler mit Ca- und P verminderten Versuchsrationen auf Basis von Mais und Soja einen pc $InsP_6$-Abbau zwischen 62-89 %, ohne dass eine exogenen Phytase zugegeben wurde (Rodehutscord et al. 2022). Es wird vermutet, dass die geringen P- und Ca-Konzentrationen zu einer erhöhten Expression und Aktivität endogener mukosaler und mikrobieller Phytasen sowie Phosphatasen führte. Der Einfluss der Mikrobiota auf den $InsP_6$-Abbau konnte auch mit Hilfe gnotobiotischen Broilern nachgewiesen werden, die im Vergleich zu konventionellen Broilern über deutlich höhere $InsP_6$-Konzentrationen im Caecum verfügten (Kerr et al. 2000). In einer anderen Studie konnte ebenfalls ein hohen pc $InsP_6$-Abbau bei gnotobiotischen Broilern festgestellt werden, der sich auf eine hohe mukosale Phytase- bzw. Phosphataseaktivität zurückführen ließ (Sommerfeld et al. 2019).

Bei Schweinen scheint der Einfluss der endogenen mukosalen und mikrobiellen Phytase- sowie Phosphataseaktivität weniger stark ausgeprägt zu sein. Der natürliche $InsP_6$-Abbau bei Schweinen fokussiert sich auf das Kolon, wo $InsP_6$ fermentativ abgebaut wird und das freigesetzte Phosphat aufgrund einer limitierten P-Absorption nicht mehr vom Tier verstoffwechselt werden kann (Schlemmer et al. 2001). Untersuchungen der *Digesta* des unteren Jejunum und des Ileums zeigten keine nachweisbare Phytaseaktivität, trotz hoher Phytasedosierung von bis zu 2000 FTU/kg Futter einer *E. coli*-Phytase. Im oberen Teil des Jejunum und im Magen konnte hingegen Phytaseaktivität nachgewiesen werden (Pagano et al. 2007; Humer et al. 2015). Zwischen Studien, welche Ca- und P defiziente Rationen basierend auf Mais und Soja verwendeten und auf die Zugabe von exogenen

Phytasen verzichteten, konnten hohe Schwankungen im pc $InsP_6$-Abbau gezeigt werden. Der pc $InsP_6$-Abbau lag zwischen 9 % und 60 % (Rodehutscord und Rosenfelder 2016). Die hohen Abweichungen lassen sich neben futterbedingten Faktoren, wie unterschiedliche Ca- und P-Konzentrationen ebenso mit methodischen Unterschieden und dem Studiendesign erklären. Hierzu zählen die Definition der Beprobungsabschnitte, Dauer der Fütterungsperioden, Alter und Adaptionszeiten der Tiere, Probenprozessierung sowie die Methode der $InsP_6$-Analyse.

Neben der endogenen Phytase- sowie Phosphataseaktivität wird der $InsP_6$-Abbau durch die Retentionszeit der *Digesta* beeinflusst. Je länger die Retentionszeit, desto mehr Zeit steht zur Verfügung die Futterbestandteile aufzuschließen und das $InsP_6$ sowie die verschiedenen Abbauprodukte zu hydrolysieren (Blaabjerg et al. 2010; Svihus et al. 2010). Im Gegensatz zu Schweinen besitzen Geflügel einen Kropf, welcher zum Aufquellen der aufgenommenen Nahrung dient. Der pH-Wert im Kropf ist abhängig von der Spezies, der mikrobiellen Population und den Futtermittelbestandteilen der Ration. Grob bewegt er sich in einem Bereich von pH 4,3-6,0 (Classen et al. 2016). Ebenso wie der pH-Wert kann der Wasseranteil und die Retentionszeit der *Digesta* im Kropf je nach Spezies und Futteraufnahme variieren. Ein niedriger pH-Wert, eine lange Retentionszeit der *Digesta* sowie ein hoher Wasseranteil bieten gute Voraussetzungen für einen effizienten $InsP_6$-Abbau im Kropf. Für die Initiierung der $InsP_6$-Hydrolyse könnte der Kropf daher eine wichtige Rolle spielen (Greiner und Konietzny 2010; Svihus et al. 2010; Zeller et al. 2016; Sommerfeld et al. 2018; Kristoffersen et al. 2021). Die Kombination aus fehlendem „Präfermentations-Organ“ und einer geringen endogenen Phytaseaktivität im GIT der Schweine im Vergleich zu Broilern könnte eine mögliche Erklärung für den geringen pc $InsP_6$-Abbau sein. Diese Hypothese bedarf jedoch weiterer Untersuchungen (Rodehutscord und Rosenfelder 2016).

Ebenso wie die Retentionszeit der *Digesta* spielt der pH-Wert in den verschiedenen Segmenten des GITs eine entscheidende Rolle beim $InsP_6$-Abbau. Zum einen beeinflusst der pH-Wert die Löslichkeit des $InsP_6$ und zum anderen die endogene- wie auch exogene Phytaseaktivität. Aufgrund des sauren Milieus gilt der Magen als Hauptwirkungsort exogener Phytasen (Dersjant-Li et al. 2015). Das $InsP_6$ ist bei niedrigem pH-Werten gut löslich und die eingesetzten exogenen Phytasen (HAP) verfügen in der Regel über eine hohe spezifische Aktivität bei pH-Werten zwischen 2,5-5,5. Die pH-Werte im Muskelmagen von Geflügel liegen zwischen 2,5-3,5 können jedoch abhängig von Spezies und Alter der Tiere variieren (Ravindran 2013). Bei Schweinen liegt der pH-Wert im Magen normalerweise zwischen 2,0-2,5 (Simon und Igbasan 2002). Frisch entwöhnte Ferkel besitzen eine geringe Kapazität HCl zu sekretieren, weswegen hier der pH-Wert höher sein kann. Der Dünndarm stellt im Gegensatz zum Magen eine pH-neutrale Umgebung dar (pH 6,5-7,5). Mit steigendem pH-Wert in Duodenum, Jejunum und Ileum nimmt der $InsP_6$-Abbau, abhängig von den biochemischen Eigenschaften der Phytasen und der Löslichkeit des $InsP_6$ ab. In der praecaecalen *Digesta* von Broilern und Schweinen konnte beispielsweise keine Phytaseaktivität mehr nachgewiesen werden (Jongbloed et al. 1992; Yu et al. 2004; Pagano et al. 2007).

Abhängig vom Alter der Tiere können sich die erwähnten tierbezogenen Faktoren deutlich unterscheiden. Zum Zeitpunkt der Geburt sind weder Anatomie und Physiologie des Verdauungstraktes voll entwickelt, noch weisen Verdauungsenzyme ihre maximalen Aktivitäten auf. Je nach Spezies variiert die Entwicklung und Physiologie des GIT und somit auch die Verdauungskapazitäten (Kirchgeßner et al. 2014). Während Wiederkäuer durch das Vormagensystem ausgesprochen auf rohfaserreiche Futtermittel eingestellt sind, findet bei Schweinen lediglich ein Rohfaserabbau im Dickdarm auf bakteriellem Wege statt. Bei Hühnern ist das Verdauungsvermögen für Rohfasern noch deutlich schwächer ausgeprägt (Kirchgeßner et al. 2014). Aus diesem Grund ist die Verfügbarkeit von schwer zugänglichen Nährstoffen limitiert.

Analog zu den Phytase- und futterbedingten Faktoren ist der Einfluss der tierbezogenen Faktoren auf den Phytatabbau sehr facettenreich. In allen drei Gruppen ist jedoch der pH-Wert ein zentraler Aspekt. So variiert der pH-Wert im Verdauungstrakt abhängig von der jeweiligen Tierspezies und kann durch Futtermittelbestandteile beeinflusst werden. Der pH-Wert wiederum beeinflusst die Löslichkeit des $InsP_6$, die Phytaseaktivität und somit die Effizienz des Phytatabbaus.

3. Zielsetzung

Aufgrund der steigenden Bedeutung für einen nachhaltigeren Einsatz von P-Verbindungen in der Nutztierhaltung wird die Nachfrage von leistungsfähigen Phytasen weiter zunehmen. Natürlich vorkommende Phytasen erfüllen die vielfältigen kommerziellen Anforderungen, die an ein Enzym für den Einsatz in Futtermitteln gestellt werden in der Regel nicht, oder nur teilweise. Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin aus bekannten Phytasegenen mit guten biochemischen Eigenschaften eine Vielzahl sequenziell neuartiger Hybrid-Phytasen zu erzeugen, welche die biochemischen Eigenschaften der eingesetzten WT-Phytasen übertreffen. Im Fokus dieser Arbeit stand dabei die biochemische und ernährungsphysiologische Bewertung der neu erzeugten Hybrid-Phytasen hinsichtlich ihrer Eignung als Futtermitteladditiv. Hierzu zählte die Bestimmung der spezifischen Aktivität, des pH-Aktivitätsprofils, der Toleranz gegenüber hohen Temperaturen und die Resistenz vor proteolytischem Abbau. Zudem wurde der $InsP_6$-Abbauweg der Phytasen analysiert und die entstanden Abbauprodukte identifiziert.

Varianten mit vielversprechenden biochemischen Eigenschaften wurden anschließend in einem *in vitro*-Modell unter komplexen Bedingungen getestet, welche den Reaktionsbedingungen im GIT von Broilern nachempfunden waren. Hier konnte der $InsP_6$-Abbauweg an komplexen Futtermatrices untersucht und bewertet werden. Es wurde der Frage nachgegangen, inwiefern sich der Abbau des natürlich vorkommenden $InsP_6$ zwischen den verschiedenen Hybrid-Phytasen unterscheidet und welchen Einfluss verschiedene Futtermittelbestanteile auf die Phytaseaktivität besitzen.

Am Ende der Arbeit wurde eine ausgewählte Hybrid-Phytase in einem Fütterungsversuch mit Broilern auf ihre Effizienz *in vivo* hin untersucht. Für einen bessere Vergleichbarkeit wurden zwei Behandlungen mit einer gut etablierten kommerziellen Phytase in den Versuch integriert. Hier sollte ein tieferer Einblick in den Abbau verschiedener $InsP_x$ im GIT der Broiler gewonnen werden, wenn auf die Zugabe von MCP in der Versuchsration vollständig verzichtet wird. Negative Effekte auf die exogene- sowie endogene Phytaseaktivität sollten so reduziert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

Die folgenden Tabellen sind alle benötigten Chemikalien, Medien, Geräte sowie verwendeten Primer, Plasmide und Enzyme aufgeführt, die während der praktischen Arbeiten am Institut für Nutztierwissenschaften in Hohenheim und im Labor der EW Nutrition GmbH in Köln verwendet wurden.

4.1.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2: Benötigte Lösungen und Chemikalien

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Chargennummer
Agarose	Biozym	520839
Ammonium-Heptamolybdat	Sigma-Aldrich	9880
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich	11140
Calciumcarbonat ($CaCO_3$)	Sigma-Aldrich	C4830
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	AppliChem	A0775,1000
DNA-Größenmarker “GeneRuler” (1 Kb)	Thermo Scientific	#SM0311
DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Scientific	# R0611
dNTP’s (2 mM)	Thermo Scientific	# B9027S
Eisennitrat-Nonahydrat	Sigma-Aldrich	216828-250G-D
Eisensulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich	215422
Essigsäure (96 %)	Merck	100.062
Ethanol (abs.)	VWR	20.821.330
Ethidiumbromid	Roth	134212522
Glycin	Sigma-Aldrich	G7126-1KG
Imidazol	Merck	I2399-500G
Kupferchlorid-Dihydrat	Merck	1027330250
Kupfersulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich	451657
Laemmli-Puffer	BioRad	# 161-0747
Mangansulfat	Sigma-Aldrich	4487.1
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Merck	1061261000
Methansulfonsäure (70 %)	Roth	4090.4
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth	P756.1
Natriumacetat	VWR	127-03-9
Natriumchlorid (NaCl)	VWR	27.810.295
Natriumflorid (NaF)	Sigma Aldrich	A7250-5G
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	VWR	APPCA3590.0500
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth	254176811
Natriumphosphat (Na_3PO_4)	Sigma-Aldrich	71911-250G
Natriumphytat	Sigma-Aldrich	68388-10G
Natronlauge NaOH (32 %)	Roth	266245356
PageBlue™	Thermo Scientific	#24620
Perchlorsäure (1 M)	VWR	30.111.291
Proteinstandard “Dual Color”	BioRad	#161-0374
Proteinstandard “Unstained”	BioRad	#161-0363
Proteinstandard “Western C”	BioRad	#161-0376
Salzsäure (HCl) (25 %)	Roth	67252027
Schwefelsäure (96 %)	Roth	27253337

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Chargennummer
Trichloressigsäure (TCA)	VWR	16A180007
TRIS	Roth	4855
Titandioxid	Merck	13463-67-7
Triton-X-100	AppliChem	A4975,1000
Tween 20	AppliChem	A4974
Zinkchlorid	VWR	29.156.231
Zinksulfat	Merck	1.088.830.500

Tabelle 3: Enzyme und zugehörige Puffer

Materialien	Hersteller	Bezeichnung
Antartic-Phosphatase	NEB	# M0289S
Antartic-Phosphatase-Puffer (10x)	NEB	# B0289S
BlpI	NEB	# R05858
BsaI	NEB	# R0535L
CutSmart™-Puffer (10x)	NEB	# B7204S
HindIII HF	NEB	# R3104S
Lysozym	AppliChem	A4972,0001
Pankreatin (Porcine Gastric)	Sigma-Aldrich	P7545
Pepsin (Porcine Gastric)	Sigma-Aldrich	P7716
Q5-DNA-Polymerase	NEB	# M0493L
Q5-Reaktionspuffer (5x)	NEB	# B9027S
Quantum Blue™	AB Vista	
T4-DNA-Ligase	Promega	# M0202S
T4-Ligase-Puffer (10x)	Promega	177054
XbaI	NEB	# R0145L

Tabelle 4: Medien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
2x LB	2 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl
Acetat-Puffer (500 mM; pH 4,75)	Na-Actetat (82,03 g/mol) 500 mM Essigsäure (60,05 g/mol) 500 mM Verhältnis 1:1
Glycin-HCl-Puffer (0,1 M; pH 3,0)	Glycin (75,07 g/mol) 100 mM HCl (36,46 g/mol) 20 mM
LB	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl
TBST-Puffer	50 mM TRIS 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20
SOB	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl

Bezeichnung	Zusammensetzung
SOC	Trypton 2 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 10 mM KCl 2,5 mM 20 mM Glucose
TAE-Puffer (pH 8,0)	2 M TRIS 1 M Na-Acetat 50 mM EDTA
TGS-Puffer (pH 8,3)	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
YPD	2 % (w/v) Pepton 1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (v/v) Glucose

4.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller	Bezeichnung
Mikrotiterplatten (384-well)	Greiner	VWR 736-0146
Mikrotiterplatten (96-well)	Greiner	M2936
Deepwell-Platten (2 ml)	Axygen	P-2ML-SQ-C
Deepwell-Platten (1 ml)	Axygen	P-1ML-SQ-C
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5-5 ml)	Eppendorf	
Erlenmeyer-Kolben (50 ml, 100 ml)	Roth	
Messzylinder	Roth	
Millipore Dialyse-Membran	Merck	VSWP02500
Petrischalen	VWR	
SDS-Gel (Stainfree)	BioRad	456-8126
Elektroporationsküvetten	VWR	*732-2924*
HPLC Vials	Macherey-Nagel	*702732*
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm, d = 25 mm)	Macherey-Nagel	
Zentrifugalfilter “Amicon” (30 kDa)	Millipore	*UFC5030BK*
Zentrifugen-Tubes	Falcon	

Tabelle 6: Kits zur DNA- und Plasmidaufreinigung

Materialien	Hersteller	Bezeichnung
DNA-Gelextraktion	NEB	T1020L
PCR & DNA-Aufreinigung	NEB	T1030L
Plasmidaufreinigung “Midiprep”	QIAGEN	19743
Plasmidaufreinigung “Miniprep”	NEB	T1010L

Tabelle 7: Geräte und Hilfsmittel

Gerät/ Hilfsmittel	Hersteller	Bezeichnung
Cleanbench	Scanlaf	Mars Safety Class 2
Filtrationskassette (0,2 µm, 10 kDa; PES)	Sartorius	Vivaflow 200
Elektroporator	Eppendorf	Eporator
Feinwaage	Sartorius	Entris 2241-1s
Fermenter (Benchtop 2 L)	Sartorius	Biostat
FPLC	GE	Äkta Pure
Gefriertrockner	Christ	Gamma 1-20
Gelkammer & Netzgerät (SDS-PAGE)	BioRad	PowerPac HV
Glucosemessgerät	Kreienbaum	YSI 2900
GraphPad PRISM	Upwork Global Inc.	
Heizblock	Eppendorf	ThermoMixer C
Heizplatte	Heidolph	
HPLC 1	Thermo Scientific	
HPLC 2	VWR-Hitachi	Chromaster
HPLC Säule 1	Thermo Scientific	Dionex Carbo Pac PA 20
HPLC Säule 2	Thermo Scientific	Dionex Carbopac PA-100
Inkubator 1	Binder	
Inkubator 2	Thermo Fisher	Cytomat
Kugelmühle	Retsch	MM 400
LED-Transilluminator	Nippon Genetics	
Mehrfachdispenser	Brand	Handystep
Mikrowelle	Sharp	Inverter
Mini-Tischzentrifuge	VWR	Ministar
Molecular Imager	BioRad	GelDoc XR+
Muffelofen	Nabertherm	
Multikanalpipette	Eppendorf	Xplorer
Nachsäulenderivatisierung 1	Dionex	ICS-3000
Nachsäulenderivatisierung 2	ASI	Model 310
Netzgerät und Gelkammer	peqLab	peqPower 300V
pH-Elektrode	Hamilton	
pH-Meter	SevenExcellence	Multiparameter
Photometer	Eppendorf	BioPhotometer D30
Pipetten	Eppendorf	Research Plus
Plattendispenser	Thermo Scientific	Multidrop Combi
Platten-Reader	Tecan	Infinite M1000 Pro
Platten-Schüttler	Thermo Electron LED	Monoshake
Plattenzentrifuge	Benchmark Scientific	PlateFuge
Rührfische	VWR	
Sauerstoff-Elektrode	Hamilton	
Scheibenschwingmühle	Fritsch	Pulverisette
Schlauchpumpe	Hirschmann	Rotarus volume 100
Schüttelinkubator	Infors HT	Multitron Pro
SDS-Gelelektrophorese-System	BioRad	Mini-Protean-Tetra

Gerät/ Hilfsmittel	Hersteller	Bezeichnung
Sequenzier-Software	GeneCodes	Sequencher
Standzentrifuge	Beckman Coulter	Avanti J-26SXP
Thermocycler	BioRad	ThermalCycler C1000 T
Tischzentrifuge 1	Beckman Coulter	Microfuge 20R
Tischzentrifuge 2	Beckman Coulter	Allegra X-15R
Tischzentrifuge 3	Eppendorf	5427R
Transfersystem (Westernblot)	BioRad	Transblot Turbo
Vortex	Scientific Industries	VortexGenie 2
Waage	Sartorius	Entris
Wasserbad		
Wärmethermostat	LAUDA	VC 2000
YASARA-Software	YASARA Biosciences	YASARA View
Zentrifugalmühle	Retsch	ZM 200

Tabelle 8: Plasmide und synthetisierte Phytasegene

Bezeichnung	Hersteller	Referenz
Buttiauxiella sp. GC21 appA-Gen	Geneart	UniProt B2KSJ7
Citrobacter braakii appA-Gen	Geneart	UniProt Q2VY22
Dickeya paradisiaca appA-Gen	Geneart	
Enterobacter sp. biph1 appA-Gen	Geneart	
Escherichia coli appA-Gen	Geneart	
Hafnia alvei appA-Gen	Geneart	UniProt H9TUK5
Obesumbacterium proteus appA-Gen	Geneart	
pBluescript II SK(-)	Agilent	212206
pHSG396-pelB-Zero	EW Nutrition	
pUC19	NEB	N3041S/L
Yersinia intermedia appA-Gen	Geneart	UniProt Q000T0

4.1.3 Primer

Tabelle 9: Verwendete Primer

Name	Sequenz (5'→3')
B. sp. GC21	
R1_Seq	AGCAGGCATTTGCAGCATGG
R1_Vektor5´	GATTCAGGTCTCTGGCATTTGCGTCAGAAACACCGGCATCAGGCTATC
R1_F1_rev	ATTCGCGGTCTCCCGGAGCCAGTCCTGCCAGAAATG
R1_F2_for	GATTCAGGTCTCCTCCGCAATGCGGACTGACAATTC
R1_F2_rev	ATTCGCGGTCTCCAGGTGTGCGTGCCATCAGATCAAATTGTG
R1_F3_for	GATTCAGGTCTCG*ACCT*TATATTGCAAGACATAATGG
R1_Vektor3´	ATTCGCGGTCTCT*TAGC*TTATTAGTGATGGTGATGATGATGTTGCAG
C. braakii	
R2_Seq	CAATTCTGGAACGCGCAGGC
R2_Vektor5´	GATTCAGGTCTCT*GGCA*TTTGCGGAAGAACAGAATGGTATG
R2_F1_rev	ATTCGCGGTCTCC*CGGA*GCCAGACCTGCCAGAAATGC
R2_F2_for	GATTCAGGTCTCGT*CCG*AAATGTCAGATTCAGGTTC
R2_F2_rev	ATTCGCGGTCTCC*AGGT*GTACGCTGCAGCAGATCGAACTGTGC
R2_F3_for	GATTCAGGTCTCG*ACCT*GAAGTTGCACGTAGCCGTGC
R2_Vektor3´	ATTCGCGGTCTCT*TAGC*TTATTAGTGATGGTGATGATGATGTTCGG
E. coli	
R3_Seq	TGACTGACGCGATCCTCAGC
R3_Vektor5´	GATTCAGGTCTC*TGGCA*TTTGCGCAGAGTGAGCCGGAGCTGAAG
R3_F1_rev	ATTCGCGGTCTCC*CGGA*GCCAGCCCGGCGGCGAAG
R3_F2_for	GATTCAGGTCTCT*TCCG*GACTGTGCAATAACCGTACATAC
R3_F2_rev	ATTCGCGGTCTCC*AGGT*GTGCGTTGTAGCAAATAAAATTGC
R3_F3_for	GATTCAGGTCTCG*ACCT*GAGGTTGCCCGCAGCCGCGCCAC
R3_Vektor3´	ATTCGCGGTCTCT*TAGC*TTATTAATGATGATGATGGTGATGCAAAC
H. alvei	
R4_Seq	ACTGATGAGCAGCGTTCTGG
R4_Vektor5´	GATTCAGGTCTCT*GGCA*TTTGCGAGCGATACCGCACCGGCAGG
R4_F1_rev	ATTCGCGGTCTCC*CGGA*GCCAGACCTGCCAGAAATGC
R4_F2_for	GATTCAGGTCTCG*TCCG*CAGTGTGATCTGGCAATTC
R4_F2_rev	ATTCGCGGTCTCC*AGGT*GTACGACTCATCAGATCAAACTGTG
R4_F3_for	GATTCAGGTCTCG*ACCT*TATATTGCAAAACATAATGG
R4_Vektor3´	ATTCGCGGTCTCT*TAGC*TTATTAGTGATGGTGATGATGATGCGGC
Y. intermedia	
R5_Seq	CAAACCGTTTGCACAGATGG
R5_Vektor5´	GATTCAGGTCTCT*GGCA*TTTGCGGCACCGGTTGCAATTCAGCCG
R5_F1_rev	ATTCGCGGTCTCC*CGGA*GCAATACCATCCAGAAATGC
R5_F2_for	GATTCAGGTCTCG*TCCG*GGTTGTGGTCTGAAAGTTC
R5_F2_rev	ATTCGCGGTCTCC*AGGT*GTTTTTGCCATCAGATCAAACTG
R5_F3_for	GATTCAGGTCTCG*ACCT*TATATTGCACGTCATAAAG
R5_Vektor3´	ATTCGCGGTCTCT*TAGC*TTATTAGTGATGGTGATGATGATGAA

Name	Sequenz (5'→3')
D. paradisiaca	
R6_Seq	GCAGGCGTTACACTGGATGC
R6_Vektor5´	GATTCAGGTCTCT*GGCA*TTTGCGACACAAGCAGCATCAACATC
R6_F1_rev	ATTCGCGGTCTCC*CGGA*AAAACGCCATCCATCAGTGCCATTG
R6_F2_for	GATTCAGGTCTCG*TCCG*GGCTGCGGCATTACAATTAG
R6_F2_rev	ATTCGCGGTCTCT*AGGT*AGGTCGTTTGTAAAATCATAATTAAC
R6_F3_for	GATTCAGGTCTCG*ACCT*TATGTTGCGAGAAGAGGCGCATC
R6_Vektor3´	ATTCGCGGTCTCT*TAGC*TTATTAATGATGATGATGGTGATGTCTTGAATA
O. proteus	
R7_Seq	AGCAGGCGTTTGCACAATGG
R7_Vektor5´	GATTCAGGTCTCT*GGCA*TTTGCGTCAGAAACAGTTCCGTCAGGCTATC
R7_F1_rev	ATTCGCGGTCTCC*CGGA*GCCAGTCCTGCCAGAAATGC
R7_F2_for	GATTCAGGTCTCG*TCCG*GAATGCCATCTGTCAATTCATC
R7_F2_rev	ATTCGCGGTCTCT*AGGT*GTGCGGCTCATCAGATCAAATTGTGCATTATGCA
R7_F3_for	GATTCAGGTCTCG*ACCT*TATATTGCAAAACATAATGG
R7_Vektor3´	ATTCGCGGTCTCT*TAGC*TTATTAATGATGATGATGGTGATGTTGGCATTC
E. sp. biph 1	
R8_Seq	AGCAGGCGGAAGCATTGAAC
R8_Vektor5´	GATTCAGGTCTCT*GGCA*TTTGCGGAAGAATCAAATGAAATGAAACTGGAA
R8_F1_rev	ATTCGCGGTCTCC*CGGA*GCAAAGCCTGCAACAAATGATTC
R8_F2_for	GATTCAGGTCTCG*TCCG*GAATGCCAAATTCAAATTCGCTATC
R8_F2_rev	ATTCGCGGTCTCT*AGGT*GTTCTTTGAAGAAGATCAAAC
R8_F3_for	GATTCAGGTCTCG*ACCT*GAAGTTGCAAGAATTAGAGCAACACCGCTG
R8_Vektor3´	ATTCGCGGTCTCT*TAGC*TTATTAATGATGATGATGGTGATGATTGCCCAG

Je Biobrick wurden zwei flankierende Primer benötigt. Für die Biobricks 1 wurden die Primer: Vektor5´ und F1_rev benötigt. Für die Biobricks 2 wurden die Primer: F2_for sowie F2_rev verwendet und für die Biobricks 3: F3_for und Vektor3´. For steht für den „Forward-Primer“. Rev steht für den „Reverse-Primer“. Seq steht für die verwendeten Sequenzierprimer. Die Rekombinationsstelle ist kursiv geschrieben.

4.2 Methoden

4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die Bausteine („*Biobricks*“) der Rekombinationsbibliothek hergestellt. Als Grundlage für die Rekombination dienten die WT-Phytasegene: *acid periplasmic polyphosphatase A* (*appA*) aus 8 unterschiedlichen Bakterien:

- *Buttiauxiella sp. GC21*
- *Citrobacter braakii*
- *Dickeya paradisiaca*
- *Enterobacter sp. biph1*
- *Escherichia coli*
- *Hafnia alvei*
- *Obesumbacterium proteus*
- *Yersinia intermedia*

Die WT-Phytasen wurden anhand ihrer biochemischen Eigenschaften und hohen strukturellen Gemeinsamkeiten ausgewählt. Sie verfügen über eine vergleichbare Enzymfaltung und zählen zu den HAP. Die Phytasegene wurden in jeweils drei Fragmente unterteilt und miteinander rekombiniert. Die hierfür benötigten 24 (8x3) *Biobricks* wurden mit Hilfe sequenzspezifischer Primer mit den 8 Phytasegenen via PCR gebildet. Für die Bildung eines *Biobricks* wurden je 2 flankierende Primer benötigt. Die benötigten Phytasegene und Primer wurden von der Firma „GenScript Biotech B.V.“ synthetisiert (Tabelle 8 und 9).

Die PCR erfolgte in PCR-Reaktionsgefäßen mit einem Gesamtvolumen von 50 µl nach einem Standard-Protokoll für Q5-DNA-Polymerasen (siehe Tabelle 10). Für die PCR wurde ein Thermocycler (BioRad) verwendet. Als Template dienten jeweils 100 ng/µl der *appA*-Phytasegene aus den 8 unterschiedlichen Organismen. In jedem Ansatz wurden je Phytasegen 10 µM der beiden spezifischen Primer eingesetzt, welche den *Biobrick* flankierten, der hergestellt werden sollte. Alle verwendeten Komponenten eines PCR-Ansatzes sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 10: Standard PCR-Programm zur Amplifikation der Biobricks

PCR-Programm	Temperatur (°C)	Zeitintervall (min)	
1x	96	2,0	
	96	1,0	Hitzedenaturierung
Insgesamt 30 Zyklen	72	1,0	Primerhybridisierung
	72	0,6	Elongation
1x	72	5,0	
1x	4	∞	

Tabelle 11: Pipettierschema PCR-Ansatz

Mastermix	1x Ansatz (µl)
DNAse/RNAse-freies H_2O	28,5
5x Q5-Reaktions-Puffer	10,0
dNTP´s (2 mM), Endkonz. (0,2 mM)	5,0
Forward-Primer (10 µM)	2,5
Reverse-Primer (10 µM)	2,5
Q5-HF-DNA Polymerase	0,5
Template (100 ng/µl)	1,0
Gesamtvolumen	50,0

4.2.2 Gelelektrophorese

Die 24 über PCR hergestellten *Biobricks* wurden mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Hierzu wurden einprozentige Agarosegele mit Ethidiumbromid verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für 45 min bei 160 V in Gelelektrophorese-Kammern (Peqlab) gefüllt mit 1x TAE-Puffer. Als Größenmarker wurde der *GeneRuler* 1 Kb (Thermo Scientific) verwendet.

Nach der Auftrennung wurden die *Biobricks* unter Zuhilfenahme des LED-Transilluminator (Nippon Genetics) und einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die anschließende Aufreinigung der *Biobricks* erfolgte mittels DNA-Gelextraktions-Kit (NEB) und den Angaben des Herstellers.

Neben der Isolierung der PCR-Produkte für die Rekombinationsbibliothek, wurde die Gelelektrophorese außerdem zur Restriktionsanalyse verwendet. In diesem Fall wurde das Gel, nach dem Auftrennen der DNA-Fragmente, mit Hilfe des „Gel-Doc XR“ und der Software „ImageLab“ (BioRad), unter UV-Licht analysiert.

4.2.3 Golden Gate-Methode

Die Klonierung der Rekombinationsbibliothek wurde mit Hilfe des *Golden Gate*-Methode durchgeführt. Die Restriktion der *Biobricks* und deren Ligation in den Ziel-Vektor fanden hier in nur einem Reaktionsansatz statt.

Alle Bestandteile eines *Golden Gate*-Ansatzes sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Das verwendete TypIIS-Restriktionsenzym (*BsaI*) schneidet außerhalb seiner Erkennungssequenz, so dass diese Sequenz nach dem Schneiden und der Ligation eliminiert wird. Ligierte DNA-Fragmente werden so kein weiteres Mal geschnitten und es kommt zur Akkumulation des gewünschten Zielmoleküls. Die Voraussetzungen für das Gelingen der Klonierung sind die spezifischen Rekombinationsstellen, welche durch die verwendeten Primer definiert wurden.

Tabelle 12: Komponenten eines Ansatzes nach der Golden Gate-Methode

Klonierung *Golden Gate*	1x Ansatz (µl)
40 fmol pHSG396_pelB-Zero (72 ng)	1,2
40 fmol appA-PCR-Produkt (32 ng)	2,1
10x Puffer T4-DNA Ligase	2,0
10 U T4-DNA Ligase HC	0,5
10 U *BsaI*	1,0
DNAse/RNAse-freies H_2O	13,2
Gesamtvolumen pro Ansatz	20,0

Zur Herstellung der Rekombinationsbibliothek wurden 32 ng der via PCR hergestellten und gepoolten *Biobricks* sowie 72 ng des Vektors *pHSG396_pelB_Zero* (EW Nutrition) verwendet. Der Vektor und die *Biobricks* wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und zusammen mit den Enzymen *BsaI* und einer T4-DNA Ligase im Thermocycler (Biorad) inkubiert. Die Reaktionsbedingungen der *Golden Gate*-Methode sind in der Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Thermocycler-Programm der Klonierung

Thermocycler-Programm	Temperatur (°C)	Zeitinterval (min)
1	37	300
2	50	5
3	80	10
4	4	∞

4.2.4 Transformation via Elektroporation

Nach erfolgreicher Klonierung wurde die Rekombinationsbibliothek in elektrokompetente *E. coli* (Top 10 F´) transformiert. Des Weiteren wurden in diesem Projekt Phytasen in *B. subtilis* (WB 600) und *P. pastoris* transformiert, um das jeweilige Enzym aufzureinigen und biochemisch zu charakterisieren. Für die Transformation via Elektroporation wurden elektrokompetente *E. coli* benötigt, welche nach dem folgenden Protokoll hergestellt wurden (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Herstellung der elektrokompetenten E. coli

	Durchführung	Inkubation
-	Sämtliche Arbeiten werden auf Eis ausgeführt!	-
1	Vorkultur: 100 µl WCB Kultur *in* 12 ml SOB-Medium (50 ml Kolben) animpfen; für Blank 2 ml SOB zurückstellen!	ü. N./150 rpm/ 37 °C
2	Hauptkultur: 4 x 250 ml SOB (1 L Kolben) mit je 2,5 ml ÜNK animpfen, bis OD600 = 0,6-0,8 wachsen lassen (ca. 2-3 h)	150 rpm/37 °C
3	Überführen: Hauptkultur auf 4 Zentrifugenröhrchen verteilen und 10 min auf Eis abkühlen	-
4	Zentrifugieren: 10 min/4000 x g/4 °C; Überstand verwerfen	-
5	1. Waschschritt: Pellet in je 250 ml steril. 10 % Glycerin resuspendieren	-
6	Zentrifugieren: 10 min/ 4000 x g/4 °C; Überstand verwerfen	-
7	2. Waschschritt: Pellet in je 125 ml 10 % Glycerin resuspendieren	-
8	Zentrifugieren: 10 min/ 4000 x g/4 °C; Überstand verwerfen	-
9	3. Waschschritt: Zellen in je 125 ml 10 % Glycerin resuspendieren	-
10	Überführen und auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilen	-
11	Zentrifugieren: 10 min/ 4000 x g/4 °C; Überstand verwerfen	-
12	Zellen im Rückfluss des restlichen Überstandes resuspendieren, Volumen ca. 2-3 ml	-
13	Volumen einstellen: Gesamtvolumen ca. 6 ml, evtl. mit 10 % Glycerin auffüllen	-
14	Einfrieren: 50 µl Aliq. in flüssigem N einfrieren (1,5 ml Eppis auf Eis vorkühlen!)	-
15	Lagerung: -80 °C	-

Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, wurde jeder Klonierungsansatz vor der Transformation für eine halbe Stunde auf einer Millipore-Membran (Merck) dialysiert, welche auf deionisiertem Reinstwasser schwimmt. Dadurch wurden die Proben von inhibitorischen Substanzen oder überschüssigen Salzen befreit.

Je Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 50 ng (max. 3 µl) Plasmid-DNA wurde zu den Zellen pipettiert, kurz gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (VWR) pipettiert. Über die anschließende Impulsentladung von 2500 V (*E. coli*), 1750 V (*B. subtilis*) oder 1500 V (*P. pastoris*) im Eporator (Eppendorf), wurde die Plasmid-DNA in die Zellen eingeschleust. Danach wurden die Zellen sofort in 1 ml, 37 °C warmen SOC-Medium (*E. coli*), 2x LB-Medium (*B. subtilis*) oder YPD-Medium (*P. pastoris*) resuspendiert und für 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln (150 rpm) zur Regeneration inkubiert. Der Transformationsansatz wurde danach entweder in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert oder eine Glycerin-Dauerkultur bei -80 °C angelegt.

Die Transformationseffizienz wurde durch das Ausplattieren eines Transformationsansatzes in verschiedenen Verdünnungen bestimmt. Sie ist definiert als die Anzahl der Bakterienkolonien, die pro µg Plasmid-DNA aus der Transformation hervorgehen.

$$Transformationseffizienz\ (TE) = \frac{Anzahl\ Kolonien}{1\ \mu g\ Plasmid\ DNA} \times Verdünnungsfaktor$$

4.2.5 Isolierung der Plasmid-DNA

Zur Identifikation der Hybrid-Phytasen wurde die Plasmid-DNA der transformierten Mikroorganismen isoliert. Dies erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Miniprep Kit (NEB) nach den Angaben des Herstellers. Um eine höhere Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde das Plasmid-Midi Kit (QIAGEN) verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA wies bei beiden Kits eine sehr hohe Reinheit auf. Anstelle des Elutionspuffers wurde die DNA mit Bi-destilliertem Wasser (ddH_2O) eluiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Biophotometer D30 (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm basierend auf dem Lambert Beer´schen Gesetz quantifiziert. Hierzu wurden 1,5 µl der gereinigten DNA auf die µCuvette G1.0 (Eppendorf) pipettiert und die Absorption der Probe gemessen.

4.2.7 Restriktionsanalyse

Die Klonierung der Rekombinationsbibliothek wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft. Dazu wurde die Plasmid-DNA von 15 zufällig ausgewählten Kolonien untersucht, die zuvor ausplattiert wurden. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* geschnitten sowie anschließend über eine Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und analysiert. Die Restriktion fand für 1 h bei 37 °C in einem Thermocycler (Biorad) statt. Alle Komponenten für einen Ansatz sind in der Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Komponenten der Restriktionsanalyse

Bestandteile	1x Ansatz (µl)
DNAse/RNAse-freies H_2O	12,0
10x CutSmart™ Puffer	2,0
Plasmid DNA (100 ng/µl)	5,0
HindIII (5 U)	0,5
XbaI (5 U)	0,5
Gesamtvolumen	20

4.2.8 Sequenzierung

Mit der Sequenzierung aufgereinigter DNA-Proben wurde das Unternehmen GATC-Biotech GmbH beauftragt. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA (400 ng) wurde nach der Konzentrationsbestimmung zusammen mit dem spezifischen Sequenzierprimer (5 µM) in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Der Ansatz wurde mit ddH_2O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und mit einer Sequenzierungs-ID von GATC-Biotech versehen. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Software „*Sequencher*“ (GeneCodes) ausgewertet.

4.2.9 Proteinaufreinigung

Alle in dieser Arbeit biochemisch charakterisierten Phytasen wurden über einen C-terminalen His-Tag via Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Zur Aufreinigung wurden die Enzyme zunächst in einem 1 L Maßstab in *B. subtilis* exprimiert. Dafür wurde mit 50 µl Glyzerindauerkultur der jeweiligen Phytase eine Vorkultur (100 ml 2x LB Medium + 20 µg/ml Neomycin) angelegt und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (1 L 2x LB Medium + 20 µg/ml Neomycin) mit einer OD von 0,05 angeimpft und für 48 h inkubiert (37 °C, 150 rpm).

Die Ernte der Kultur erfolgte nach 48 h durch die Zentrifugation bei 10000 x g für 45 min bei 4 °C in 400 ml Zentrifugenröhrchen. Der Überstand wurde abgenommen, mikrofiltriert und anschließend ultrafiltriert. Dazu wurden Tangentialfluß-Filtrationskassetten (Sartorius) mit einem Größenausschluss von 0,2 µm bzw. 10 kDa verwendet. Das Retentat der Ultrafiltration wurde auf ca. 100 ml konzentriert und anschließend mit Puffer A (100 mM MES, 1 mM $CaCl_2$, pH 6,5) auf 150 ml aufgefüllt.

Die Aufreinigung über die Säule erfolgte mit Hilfe der FPLC (Cytiva), welche über die „Unicorn“ Software (Cytiva) bedient wurde. Das auf 100 ml eingeengte und mit 50 ml Puffer A versetzte Konzentrat wurde auf die bereits equilibrierte 20 ml Nickel-NTA-Säule (Kronlab; Füllmaterial: Macherey-Nagel) geladen (4 ml/min). Es folgten zwei Waschschritte zuerst mit 96 % Puffer A und 4 % Puffer B (100 mM MES, 1 mM $CaCl_2$, 250 mM Imidazol, pH 6,5) und anschließend mit 90 % Puffer A + 10 % Puffer B. Die Waschschritte erfolgten für jeweils 20 min bei einer Durchflussrate von 4 ml/min. Anschließend konnte das an die Säule gebundene Enzym mit 100 % Puffer B eluiert werden (3 ml/min). Die Elutionsfraktionen wurden durch den Fraktionssammler (Cytiva) automatisch in 2 ml 96-D*eepwell*-Platten (Axygen) aufgefangen.

4.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der aufgereinigten Phytasen wurde mittels „BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Fisher Scientific) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Das Prinzip der Methode beruht auf einer hoch sensitiven, kolorimetrischen Detektion der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} unter

Ausbildung eines Farbkomplexes mit Bicinchoninsäure (BCA). Die Bildung des Farbkomplexes ist abhängig von der Proteinkonzentration und kann bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden.

Vergleichend wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe der Nanoquant Platte (Tecan) bestimmt. Hier wurde die Absorption einer gereinigten Proteinprobe bei 280 nm Wellenlänge gemessen. Dazu wurden 3 µl der Probe aufgetragen. Als Blank diente der Puffer, in dem das gereinigte Enzym gelöst wurde. Zur Berechnung der Proteinkonzentration über das Lambert-Beer´sche Gesetz musste der Extinktionskoeffizient berechnet werden. Der theoretische millimolare Extinktionskoeffizient wurde aus der Aminosäuresequenz des zu analysierenden Proteins mit Hilfe des Programmes: „*ProtParam*“ berechnet, welches vom „*Swiss Institute of Bioinformatics*“ zur Verfügung gestellt wird (*https://web.expasy.org/protparam*).

4.2.11 Denaturierende SDS-PAGE

Über die denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) wurden Phytasen nach ihrer Aufreinigung über ihre molekulare Größe hin aufgetrennt. Die zu analysierenden Proben wurden mit dem *Laemmli*-Puffer (BioRad) 4:1 gemischt und für 5 min mit einem Thermomixer (Eppendorf) bei 95 °C aufgekocht. Aufgetragen wurden 12 µl der Proben in Fertiggele mit einem Gradienten von 4-15 % (Biorad). Anschließend wurden die Proben in einer Elektrophoresekammer (Biorad) mit TGS-Puffer bei 25 mA pro Gel aufgetrennt. Als Größenmarker wurden die Standards „*Protein Unstained*“ und „*Dual Color*“ (BioRad) verwendet. Visualisiert wurden die Gele mittels „Gel Doc XR“ und der Software „ImageLab“ von BioRad. In einigen Fällen wurde das Gel anschließend mit *PageBlue*™ (Thermo Scientific) eingefärbt und analysiert.

4.2.12 FeMo-Assay

Mit Hilfe des FeMo-(Eisen-Molybdat)-Assays wurde die Volumenaktivität der in diesem Projekt verwendeten Phytasen bestimmt. Das Prinzip der Methode beruht auf der Komplexierung des von der Phytase freigesetzten Pi, was in Präsenz von Schwefelsäure mit Eisen und Ammoniummolybdat zur Bildung eines blauen Farbstoffes (Eisenmolybdänblau) führt. Die Extinktion des Komplexes kann bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen werden. Die Intensität der blaugefärbten Probe ist proportional zur freigesetzten Pi-Konzentration und somit auch proportional zur Aktivität der Phytase. Der FeMo-Assay besteht aus zwei voneinander unabhängig ablaufenden Reaktionen. Bei jeder Messung wurde eine Na_2HPO_4 Standardreihe (0-10 mM) mitgemessen, mit der die Pi-Konzentration der Proben berechnet werden konnte.

Phytatreaktion: Die zu analysierenden Proben wurden in ddH_20 mit 0,01 %TritionX-100 verdünnt. 10 µl der verdünnten Proben und 20 µl der Standards wurden als Vierfach-Bestimmung in eine 384-*well* Mikrotiterplatte (Greiner) pipettiert. Anschließend wurden 10 µl des Phytatassay (Tabelle 16) zu

den verdünnten Proben pipettiert und die Platte für 30 min bei 37 °C im Thermomixer mit Thermotop (Eppendorf) inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss durch die Zugabe von 20 µl TCA (20 %) gestoppt.

Farbreaktion: Zunächst wurden 4 Teile der Molybdat-Lösung mit einem Teil der Eisensulfat-Lösung gemischt (siehe Tabelle 16). Anschließend wurden 40 µl der Farbreagenz zu den Proben der Phytatreaktion und Standards pipettiert (1:1), kurz auf einem Plattenschüttler (Thermo Electron LED) homogenisiert und geschützt vor Licht bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Zum Schluss erfolgte die Messung im Plattenreader (Tecan) bei einer Wellenlänge von 650 nm. Anhand der Standardreihe ließ sich die Phosphatkonzentration der Phytaseproben berechnen. Es wurde darauf geachtet, dass die Extinktionen ≤ 2 waren, da ansonsten die Linearität zwischen absorbiertem Licht und der Phosphatkonzentration nicht mehr gegeben ist.

Tabelle 16: Verwendete Lösungen und Puffer im FeMo-Assay

Puffer/Lösung	pH-Wert	Zusammensetzung
Acetat-Puffer	5,5[1]	250 mM Na-Acetat 5,1 mM Na-Phytat
Glycin–HCl-Puffer	3,0[2]	250 mM Glycin-HCl 5,1 mM Na-Phytat
Eisensulfat-Lösung		5,4 g Fe(II)Sulfat-Heptahydrat 2,5 ml konzentrierte Schwefelsäure Verdünnt mit ddH_20 auf insgesamt 50 ml
Molybdat-Lösung		3 g Ammonium-Heptamolybdat 9 ml konzentrierte Schwefelsäure Verdünnt mit ddH_20 auf insgesamt 200 ml

1) pH-Wert eingestellt mit Essigsäure bzw. 2) mit HCl.

4.2.13 MolA-Assay

Der MolA-(Molybdat-Ascorbat)-Assay basiert auf dem gleichen Prinzip wie der FeMo-Assay, ermöglicht aber die Quantifizierung von Pi in komplexeren Proben, wie beispielsweise einer Futtermatrix. Der MolA-Assay wurde außerdem verwendet, um den Einfluss von polyvalenten Kationen auf die Phytaseaktivität zu bestimmen.

Um die Phytaseaktivität der experimentellen Versuchsrationen des Tierversuches zu analysieren, wurden die Proben zunächst 1:10 (w/v) in ddH_2O für 30 min unter stetigem rühren gelöst. Anschließen wurde 1 ml der homogenen Suspension entnommen, zentrifugiert (5 min, 20000 x g) und anschließend eine Phytatreaktion (siehe 4.2.12) in 4x Bestimmung durchgeführt. Die Pi-Freisetzung wurde nach der Phytatreaktion mittels MolA-Assay quantifiziert.

Die zu analysierenden Proben wurden in einem ersten Schritt für 15 min bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes abgenommen und, je nach Konzentration der Probe, mit ddH_2O 1:5 verdünnt. Von den Verdünnungen wurden 50 µl entnommen und 1:1 mit 20 % TCA in einer 96-*well* Mikrotiterplatte mit U-Boden (Greiner) gemischt. Anschließend wurde die Platte für 10 min zentrifugiert (4 °C, 4000 x g).

Zur Quantifizierung des freigesetzten Pi via MolA-Assay wurden 10 µl der Überstände und Standards in eine 384-*well* Mikrotiterplatte (Greiner) pipettiert und mit 50 µl Farbreagenz gemischt. Die Farbreagenz ist vor der Messung frisch anzusetzen und besteht aus 5 Teilen Ascorbinsäure-Lösung (Ascorbinsäure 10 % (w/v) in 1 M Schwefelsäure) und einem Teil der Molybdat-Lösung (Ammonium-Heptamolybdat 5 % (w/v) in ddH_2O). Die Farbreagenz wurde 1:9 mit ddH_2O verdünnt und zu den Proben pipettiert. Anschließend wurde die Platte vor Licht geschützt bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Die Messung der Extinktion und Berechnung der Pi-Konzentration erfolgte analog zur FeMo-Assay mit Hilfe einer Standardreihe.

4.2.14 Spezifische Aktivität

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität einer Phytase wurde die Volumenaktivität bei verschiedenen Zeitpunkten (30, 45, 60 min) via FeMo-Assay unter genau definierten Bedingungen und unterschiedlichen Verdünnungen bestimmt. Je nach pH-Wert wurde ein 50 mM Glycin-HCl-Puffer (pH 3,0) oder Na-Acetat-Puffer (pH 5,5) verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug immer 37 °C. Als Substrat diente 5,1 mM Na-Phytat (Sigma-Aldrich). Anschließend wurde die Pi-Konzentration berechnet, welche pro Minute von der Phytase freigesetzt wurde. Unter Berücksichtigung der Reaktionsvolumina konnten die Units pro ml und min ermittelt werden. Zum Schluss wurden die U/ml durch die ermittelte Proteinkonzentration der eingesetzten Phytase geteilt, um die spezifische Aktivität in U/mg Protein zu erhalten.

4.2.15 pH-Aktivitätsprofil

Mit dieser Methode wurde das pH-Aktivitätsprofil der untersuchten Phytasen bestimmt. Analog zum FeMo-Assay besteht diese Methode ebenfalls aus einer Phytat- und Farbreaktion.

Die Phytatreaktion fand in 12 verschiedenen Puffern (pH 2,0–7,0) statt (siehe Tabelle 17). Alle Puffer enthielten 5,6 mM Na-Phytat. Die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung sind der Tabelle 17 zu entnehmen. Je Puffer wurden 2x 6 µl der verdünnten Enzymprobe in eine 384-*well* Mikrotiterplatte (Greiner) vorgelegt. Anschließend wurde jeweils 48 µl der 12 Puffer zu den Proben pipettiert (jede Reihe ein anderer pH-Wert). Nach kurzem homogenisieren wurden die Proben für 30 min bei 37 °C und 750 rpm im Thermomixer mit Thermotop (Eppendorf) inkubiert. Im Anschluss wurde die Phytatreaktion gestoppt, indem 20 µl der Proben in eine weitere Mikrotiterplatte transferiert

wurden, in der 20 µl TCA (20%) vorgelegt waren. Die anschließende Farbreaktion erfolgte entsprechend der Durchführung des FeMo-Assays.

Zur Auswertung der Daten wurde die Volumenaktivität der Phytase bei den unterschiedlichen pH-Werten in Relation zur höchsten Aktivität (pH-Optimum) gesetzt. So erhielt man zu jedem gemessenen pH-Wert die Restaktivität der Phytase in Prozent.

Tabelle 17: Verwendete Puffer zur Ermittlung des pH-Aktivitätsprofil.

Bezeichnung	pH-Wert	Zusammensetzung
Acetat-Puffer	4,0; 4,5; 5,0; 5,5[1]	250 mM Na-Acetat 5,6 mM Na-Phytat 5,6 mM $CaCl_2$
Glycin–HCl-Puffer	2,0; 2,5; 3,0; 3,5[2]	250 mM Glycin-HCl 5,6 mM Na-Phytat 5,6 mM $CaCl_2$
MES-Puffer	5,5; 6,0; 6,5; 7,0[3]	250 mM MES 5,6 mM Na-Phytat 5,6 mM $CaCl_2$

1) pH-Wert eingestellt mit Essigsäure bzw. 2) mit HCl oder 3) mit NaOH.

4.2.16 Pepsinresistenz

Zur Analyse der Enzymstabilität gegenüber proteolytischem Abbau wurden die untersuchten Phytasen für 30 min bei pH 2,5 einmal mit Pepsin und ohne Pepsin inkubiert. Nach der Inkubation wurde dann die Volumenaktivität der Proben mit Hilfe des FeMo-Assays bestimmt. Die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung sind in der Tabelle 18 dargestellt.

Die aufgereinigten Phytasen wurden mit ddH_2O verdünnt und in einer vierfachen Bestimmung mit den Puffern 1, 2 oder 3 in eine 384-*well* Mikrotiterplatte pipettiert (1:1). Die Puffer enthalten 5 mg/ml verdautes *Bovine serum albumine* (BSA) zur Stabilisierung. Es folgte die Inkubation für 30 min im Thermomixer mit Thermotop (Eppendorf) bei 37 °C und 150 rpm. Die ermittelte Phytaseaktivität bei pH 5,5 mit dem Puffer 3 diente als Referenz für die Bestimmung der Restaktivität der Phytasen, die in Prozent angegeben wurde.

Tabelle 18: Verwendete Puffer im Pepsin-Stabilitäts-Assay

Bezeichnung	pH- Wert	Zusammensetzung
Puffer 1	2,5[1]	100 mM Glycin-HCl 5 mg/ml vBSA 10 mM $CaCl_2$
Puffer 2	2,5[1]	100 mM Glycin-HCl 5 mg/ml vBSA 10 mM $CaCl_2$ 0,5 mg/ml Pepsin
Puffer 3	5,5[2]	100 mM Na-Acetat 5 mg/ml vBSA 10 mM $CaCl_2$

1) pH-Wert eingestellt mit Essigsäure bzw. 2) mit HCl.

4.2.17 IT-50-Assay

Mit dem IT50-Assay wurde die Hitzetoleranz der getesteten Phytasen ermittelt, indem die Temperatur ermittelt wurde, bei der die getestete Phytase über ihre halbmaximale Aktivität verfügt. Hierzu wurden die Proben in einem Temperaturgradienten (40–88 °C in je 4 °C Schritten) inkubiert und anschließend die Restaktivität zu einer Referenzprobe bestimmt, welche bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Bestimmung der Phytaseaktivität erfolgte analog der Phytat- und Farbreaktion des FeMo-Assays.

Die zu analysierenden Proben wurden in einem speziellen Puffer (siehe Tabelle 19) verdünnt. Je *well* wurden 50 µl der verdünnten Proben in eine 96-*well* PCR-Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit Aluminiumfolie abgeklebt wurde, um die Proben vor dem Verdampfen zu schützen. Insgesamt wurden die Proben für 10 min mit Temperaturgradienten in einem Thermocycler (BioRad) inkubiert. Als Referenz für die Restaktivität wurde jeweils eine Probe der untersuchten Phytase bei Raumtemperatur inkubiert. Bei jeder Temperatur des Gradienten wurde die Restaktivität der Phytasen im Bezug zur Referenzprobe ermittelt. Mit Hilfe des Programmes „GraphPad PRISM“ (Upwork Global Inc.) wurde die exakte Temperatur ermittelt, bei der die Phytase eine Restaktivität von 50 % aufwies.

Tabelle 19: Thermaler Inkubationspuffer IT-50

Bezeichnung	pH-Wert	Zusammensetzung
Thermaler Inkubationspuffer	5,5	100 mM Na-Acetat 100 mg/ml vBSA 10 mM $CaCl_2$ 10 % Triton-X-100 (w/v)

4.2.18 In vitro-Modell

Zur Untersuchung der Phytaseeffizienz unter Bedingungen nahe der Realität sowie komplexen Futtermatrices wurde das *in vitro*-Model nach Sommerfeld et al. (2017) verwendet. Das Modell ist

eine Annäherung an die Verhältnisse im GIT von Broilern und simuliert die Abschnitte Kropf, Muskelmagen und Ileum. Die Methode berücksichtigt die pH-Werte der verschiedenen Segmente im GIT, den Wassergehalt, Temperatur, Retentionszeiten und die Anwesenheit von proteolytischen Enzymen wie Pepsin und Pankreatin.

Vor den Experimenten mussten für jedes der verwendeten Futtermatrices die pH-Werte der 3 Phasen Kropf, Magen und Ileum sowie der anschließenden $InsP_x$-Extraktion eingestellt werden. Die Zusammensetzung der verwendeten Futtermatrices sind in der Tabelle 20 dargestellt. Die Futtermatrix F1 enthielt 14 µg/g $InsP_6$-P und F2 19,7 µg/g $InsP_6$-P Futter (4x Bestimmung).

Tabelle 20: Zusammensetzung der Futtermatrices im in vitro-Modell (g/kg Futter).

Futterbestandteil	Futtermatrix F1	Futtermatrix F2*
Mais	764	400
Sojaextraktionsschrot	12,5	120
Kartoffelprotein	180	-
Weizenextraktionsschrot	-	150
Gerste	-	30,0
Sojaöl	15,0	-
Pflanzenmixfett	-	20,0
Sonnenblumenschrot	-	120
Rapsextraktionsschrot	-	60,0
Futterkalk	12,8	80,0
Vitamin Prämix[1]	1,5	-
Mineral Prämix[2]	-	2,0
Mineral Prämix[3]	1,0	-
DL-Methionin	0,7	2,1
L-Lysin HCl	-	3,5
L-Arginin	1,5	-
Natriumbicarbonat	3,0	2,0
NaCl	1,0	1,5
Cholinchlorid	2,0	1,0
Titandioxid	5,0	-
MCP	-	5,0

1) Vitaminprämix (Reifeisenkraftfutterwerke Süd GmbH, Würzburg), angegeben pro kg der vollständigen Ration: Vitamin A, 9000 IU; Vitamin D_3, 2250 IU; Vitamin E, 22,5 mg; Vitamin K_3, 1,8 mg; Vitamin B1, 2,25 mg; Vitamin B2, 4,5 mg; Vitamin B6, 4,5 mg; Vitamin B12, 22,5 µg; Nikotinsäure, 37,5 mg; Pantothensäure, 10,5 mg; Folinsäure, 0,75 mg; Biotin, 75 µg.

2) Mineralprämix (Josef Leimüller GmbH, Neumarkt a.W.) angegeben pro kg der vollständigen Ration: Mg-Oxid, 16,2 mg; Cl, 4,8 mg; Fe als Fe-II-Sulfat 25,0 mg; Mn als Mn-II-Oxid 90,0 mg; Zn als Zn-Oxid 80,0 mg; Cu als Cu-II-Sulfat 10,0 mg; Ca-Iodid 1,0 mg, Se als Na-Selenit 0,3 mg; Vitamin A, 10000 IU; Vitamin D/D3, 3000 IU; Vitamin E, 30,0 mg.

3) Mineralprämix (Gelamin SG 1, GFT mbH, Memmingen), angegeben pro kg der vollständigen Ration; Mn, 120 mg; Fe, 90 mg; Zn, 80 mg; Cu, 15 mmg; I, 1,6 mg; Co, 0,6 mg; Se, 0,5 mg.

**Kalkulierte Zusammensetzung basierend auf den Nährstoffgehalten des Futtermittels. Genaue Zusammensetzung nicht bekannt, da es sich um ein kommerzielles Futtermittel der Josef Leimüller GmbH handelt. Name des Futtermittels ist: „Leimüller Legehennenfutter Spezial“.*

Je nach Futtermittelbestandteilen werden unterschiedliche Mengen HCl, $NaHCO_3$ und NaOH benötigt, um die erforderten pH-Werte der unterschiedlichen Phasen zu erreichen (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Einstellen der pH-Werte für das in vitro-Modell.

Futtermatrix	Kropf (pH 5,6)		Magen (pH 2,8)		Ileum (pH 6,1)	Extraktion (pH 8,0)	
	H_2X	HCl (1,5 M)	HCl (1,5 M)	Pepsin-Lösung[1]	Pankreatin-Lösung[2]	Extraktions-Lösung[3]	NaOH (10 M)
F1	1500	35	470	100	504	7391	23
F2	1500	12	750	100	535	7168	42

1) 30000 U/ml in ddH_2O; 2) Pankreatin-Lösung: 3,7 mg/ml in 1 M $NaHCO_3$; 3) 0,2 M EDTA + 0,2 M NaF in ddH_2O pH 8,0. H_2X: ddH_2O mit 0,01 % TritonX-100. Je Futtermatrix wurden genau 1 ± 0,01 g eingesetzt. Die verwendeten Volumina der Lösungen, HCl sowie NaOH sind in µl angegeben.

Das Futter wurde mit einer Zentrifugalmühle (Retsch) auf 0,5 mm vorgemahlen und mit einer Scheibenschwingmühle (Fritsch) pulverisiert. Die zu testende Phytase wurde in 1,5 ml ddH_2O mit 0,01 % TritonX-100 auf die gewünschte Konzentration verdünnt und zu 1 g der Futtermatrix in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Anschließend wurde die benötigte Menge HCl (1,5 M) pipettiert, um den pH-Wert auf 5,6 einzustellen. Die Probe wurde daraufhin bis zur Homogenität gevortext (es empfiehlt sich die Zugabe eines kleinen Rührfisches). Anschließend wurde die Probe unter leichtem Schütteln für 30 min in einem 40 °C warmen Wasserbad inkubiert.

Nach der Kropf-Phase wurde die Pepsin-Lösung und HCl (1,5 M) zu der Probe pipettiert, um den pH-Wert auf 2,8 abzusenken. Die Probe wurde homogenisiert und für weitere 45 min im Wasserbad inkubiert. Zu Beginn der Ileum-Phase wurde der pH-Wert durch das Hinzufügen von der $NaHCO_3$-Pankreatin-Lösung auf 6,1 erhöht. Im Anschluss wurde die Probe homogenisiert und für weitere 60 min im Wasserbad inkubiert.

Nach Beendigung der Ileum-Phase folgte das Abstoppen der Reaktion und die Extraktion der $InsP_x$ bei einem pH-Wert von 8. Hierzu wurde die Probe mit der Extraktionslösung und NaOH auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis unter konstanter Durchmischung auf einem Schüttler (128 rpm). Anschließend wurde die Probe für 15 min zentrifugiert (4 °C, 12000 x g) und der Überstand in einem separaten Zentrifugenröhrchen auf Eis gelagert. Das Pellet wurde mit 5 ml der Extraktionslösung resuspendiert und für weitere 30 min auf Eis geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4 °C, 12000 x g) wurden die Überstände vereinigt. 1 ml der Lösung wurde dann in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (14000 x g). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter

filtriert und mittels Zentrifugalfilter (Cut off 10 kDa, Amicon) aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten $InsP_x$ erfolgte mittels HPIC-Analyse (siehe 4.2.26).

4.2.19 Einfluss polyvalenter Kationen auf die Phytaseaktivität

$InsP_6$ besitzt aufgrund seiner negativen Ladungen ein hohes Potential, positiv geladene Moleküle zu komplexieren. Die Ausbildung von Mineral-Phytat-Komplexen ist dabei stark vom jeweiligen Ion und dem pH-Wert abhängig. Um den Zusammenhang von hohen Mineralstoffgehalten und einem reduzierten Phytatabbau zu untersuchen, wurde eine Versuchsreihe mit einigen gängigen Mineralstoffverbindungen *in vitro* durchgeführt. Getestet wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen von $CaCl_2$, $FeSO_4$, $MnSO_4$ und $ZnSO_4$ auf die Pi-Freisetzung, als Maß für die Phytaseaktivität und den Phytatabbau. In den Experimenten wurde sowohl die Mineralstoffkonzentrationen als auch der pH-Wert der Phytasereaktion variiert. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der Hybrid-Phytasen und des Umfangs der durchgeführten Experimente, wurde der Einfluss der gewählten Mineralstoffe exemplarisch für die WT-Phytase aus *E. coli* untersucht. Der Versuchsaufbau lässt sich in zwei Teile gliedern:

1. Phytatreaktion mit steigenden $CaCl_2$, $FeSO_4$, $MnSO_4$ und $ZnSO_4$ Konzentrationen (0-2 mg/ml) bei 6 unterschiedlichen pH-Werten (3,0-5,5 in je 0,5er Schritten).

2. MolA-Assay zur Quantifizierung der freigesetzten Pi-Konzentration durch die *E. coli* WT-Phytase.

Die Phytatreaktionen, mit unterschiedlichen Mineralstoffkonzentrationen und pH-Werten wurden in einer 1 ml *Deepwell*-Platte (Axygen) durchgeführt. Als Puffer für die Phytatreaktion wurde ein 500 mM Glycin-HCl Puffer (pH-Bereich 3,0-4,0) und 500 mM Na-Acetatpuffer (pH-Bereich 4,5-5,5) mit einer Na-Phytat Konzentration von 10,2 mM verwendet. Je *Deepwell*-Platte wurde eine serielle Verdünnung mit den unterschiedlichen Mineralstoffen in ddH_2O vorgelegt (200 µl). Die Platte wurde auf 37 °C vortemperiert und in jede Zeile 200 µl einer der verschiedenen Puffer mit Na-Phytat pipettiert (jede Zeile ein anderer pH-Wert). Mit Zugabe der verschiedenen Puffer wurde die Phytatreaktion gestartet. Die Platte wurde mit einer Folie zugeklebt und für 30 min bei 37 °C mittels Thermomixer (Eppendorf) inkubiert und geschüttelt (150 rpm). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Phytatreaktion durch die Zugabe von 20 % TCA-Lösung in einem Verhältnis von 1:1 abgestoppt. Die Quantifizierung der freigesetzten Menge Pi erfolgte im Anschluss über den sogenannten MolA-Assay (siehe 4.2.13).

4.2.20 In vivo-Fütterungsversuch an Broilern

Mit Hilfe des Fütterungsversuchs an Broilern sollte untersucht werden, inwieweit der *in vitro* gezeigte Phytatabbau der Hybrid-Phytasen unter den anspruchsvollen Bedingungen *in vivo* reproduziert werden kann, wenn auf die Zugabe von mineralischem Phosphor verzichtet wird. Um die Anzahl an

Versuchstieren zu begrenzen, wurde sich für eine der Hybrid-Phytasen entschieden, welche über vielversprechenden biochemischen Eigenschaften verfügte und einen effizienten $InsP_x$-Abbau zeigte.

Für den Tierversuch wurden insgesamt 440 männliche, einen Tag alte Broiler (Ross 308) von einer kommerziellen Brüterei (Brüterei Süd GmbH &Co., Regenstauf) bezogen. Nach der Einwaage der Tiere wurden sie gleichmäßig zu je 11 Tieren auf 40 Bodenabteile (115x230 cm Grundfläche) eingestallt. Die Tiere wurden routinemäßig gegen Kokzidiose, *Newcastle Disease* und infektiöse Bursitis geimpft.

Der Versuchsaufbau gliederte sich in zwei Phasen. In Phase I (Tag 1-10) wurden alle Tiere mit dem gleichen, handelsüblichen Starterfutter (Club Mastkükenstarter, Deuka) gefüttert und unter identischen Bedingungen auf Einstreu gehalten. Der Nährstoff- und Energiegehalt des Starterfutters war entsprechend den Versorgungsempfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE 1999) bedarfsdeckend. Mit Phase I sollte verhindert werden, dass es bei einer Versuchsgruppe zu Mangelerscheinungen, durch eine zu geringe P-Versorgung kommen könnte.

Zu Beginn der zweiten Phase (Tag 11-21) wurden alle Tiere erneut gewogen und anhand ihres Gewichtes gleichmäßig (± 500 g) auf alle 40 Bodenabteile verteilt. Die Versuchstiere erhielten nun das experimentelle Versuchsfutter nach einem randomisierten, vollständigen Blockdesign. Gefüttert wurden 5 unterschiedliche Versuchsdiäten in 8 Wiederholungen (= 8 Abteile pro Versuchsdiät). Die Versuchsdiäten unterschieden sich nur durch die vorgenommenen Enzymbeimischungen. Zwei der 5 Versuchsdiäten enthielten die Hybrid-Phytase (OHO) in zwei unterschiedlichen Dosierungen (500- und 1500 FTU/kg). Als Referenz für die Effizienz des Phytatabbaus wurde eine kommerzielle Phytase (Quantum Blue 5 G, AB Vista) in den Versuch integriert. Diese Phytase wurde ebenfalls in zwei Dosierungen (500- und 1500 FTU/kg) der einheitlichen Grundmischung zugesetzt. Eine der Versuchsdiäten enthielt keine exogene Phytase (Basal) (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Übersicht der Versuchsdiäten im Tierversuch

Behandlung	Phytase	Anzahl Abteile	Broiler je Abteil	Anzahl Broiler
1	-	8	11	88
2	Hybrid-Phytase[1] (500 FTU/kg)	8	11	88
3	Hybrid-Phytase[1] (1500 FTU/kg)	8	11	88
4	Kommerzielle Phytase[2] (500 FTU/kg)	8	11	88
5	Kommerzielle Phytase[2] (1500 FTU/kg)	8	11	88

[1]*OHO-Phytase EW-Nutrition (Prototyp mit vorläufiger Zulassung)*

[2]*Quantum Blue, AB Vista*

Von Tag 14 an wurde die Einstreu entfernt und alle Versuchstiere auf perforierten Böden gehalten. Die Stalltemperatur betrug an den ersten beiden Tagen nach dem Einstallen 34 °C bzw. 32 °C und wurde bis zu einer Temperatur von 26 °C um 0,5 °C pro Tag reduziert. Während der ersten zwei Tage wurde der Stall durchgängig beleuchtet (10 lux). Ab Tag 3 folgte ein Wechsel zwischen 18 h Hell- und 6 h Dunkelperioden. Futter und Wasser standen den Tieren dauerhaft *ad libitum* zur Verfügung.

Der Tierversuch wurde an der Versuchsstation „Unterer Lindenhof“ der Universität Hohenheim durchgeführt. In Übereinstimmung mit der Tierschutzbeauftragten wurde der Versuch von der zuständigen Behörde des Regierungspräsidiums Tübingen am 29.07.2020 genehmigt (Tierversuch-Nr. HOH 61/20 TE). Außerdem wurde für den Einsatz der nicht zugelassenen Hybrid-Phytase (OHO) am 14.09.2020 eine Ausnahmegenehmigung der zuständigen Behörde in NRW (LANUF) erteilt.

Das experimentelle Versuchsfutter auf Soja/Mais-Basis wurde entsprechend der Kalkulation (siehe Tabelle 23) in der zertifizierten Futtermühle der Versuchsstation „Unterer Lindenhof“ (Eningen, Deutschland) der Universität Hohenheim gemischt. Die Mineralstoffe und AS sowie der unverdauliche Marker Titandioxid wurden mit 100 kg Mais vorgemischt und anschließend zu der Grundmischung in den großen Mischer gegeben. Es wurde eine Grundmischung von 900 kg hergestellt, die in 5 gleichgroße Portionen zu je 107 kg aufgeteilt wurde. Die Rationen 2 und 3 enthielten die Hybrid-Phytase (OHO), die Rationen 4 und 5 enthielten die QB-Phytase in je zwei Dosierungen (500- bzw. 1500 FTU/kg Futter). Der Basalration 1 waren keine exogenen Enzyme zugesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass die OHO-Phytase nur Temperaturen bis 65 °C gut tolerieren konnte, wurde das Versuchsfutter nicht pelletiert.

Tabelle 23: Zusammensetzung der experimentellen Versuchsration für den Broilerversuch (g/kg)

Futterbestandteil	Kalkulierte Versuchsration
Mais	561,1
Sojaextraktionsschrot	350,0
Rapsextraktionsschrot	40,0
Sojaöl	25,0
Futterkalk	8,4
Vitaminprämix[1]	2,0
DL-Methionin	2,0
Natriumbicarbonat	3,0
NaCl	1,0
Cholinchlorid	2,0
Mineralmix[2]	0,5
Titandioxid	5,0

1) Vitaminprämix, angegeben pro kg der vollständigen Ration: 1200 IU Vitamin A, 3000 IU Vitamin D3, 30 mg DL-α-Tocopherylacetat, 2,4 mg Vitamin K3, 3 mg Vitamin B1, 6 mg Vitamin B2, 6 mg Vitamin B6, 30 µg Vitamin B12, 50 mg Nikotinsäure, 14 mg Pantothensäure, 1 mg Folinsäure, 0,1 mg Biotin.

2) Mineralprämix (Gelamin, Gesellschaft für Tierernährung mbH, Memmingen, Germany), angegeben pro kg der vollständigen Ration: 240 mg Ca aus CaCO3, 100 mg Mn aus Mn-(II)-Oxid, 65 mg Zn aus Zn-Oxid, 25 mg Fe aus Fe-(II)-Carbonat, 7 mg Kupfer aus Kupfer-(II)-Sulfatpentahydrat, 4 mg Iod aus Ca-iodid, 0,3 mg Selen aus Na-Selenit.

Es wurden repräsentative Proben der verschiedenen Rationen entnommen und folgende Inhaltsstoffe analysiert: TM, Ca-, Titan (Ti)-, P-, $InsP_6$-Konzentration (siehe 4.2.23) und die Phytaseaktivität (siehe 4.2.13). Die Ergebnisse der Analyse sind in der Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Analyse der experimentellen Versuchsration des Broilerversuches

Komponenten	Basal	OHO 500	OHO 1500	QB 500	QB 1500
Ca	6,1	6,5	6,8	6,9	6,5
P	4,5	4,6	4,6	4,6	4,6
Ti	5,3	5,6	6,1	6,2	5,6
MI	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4
$Ins(1,2,3,4,5)P_5$[1]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$Ins(1,2,4,5,6)P_5$[2]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
$InsP_6$-P	11,3	11,5	11,4	11,1	11,1
Phytaseaktivität	<30	569	1637	521	1608

Analysierte Konzentrationen des unverdaulichen Markers Titandioxid als Titan (Ti), Calcium (Ca), Phosphor (P) in g/kg TM. $InsP_6$-P, Inositolphosphat-Isomere[1,2] und myo-Inositol (MI) in µmol/g TM sowie die Phytaseaktivität (FTU/kg) der Versuchsrationen im Fütterungsversuch der Broiler.

4.2.21 Schlachtung und Beprobung der Tiere

Aufgrund der aufwendigen Beprobung wurde die Schlachtung auf zwei Tage (Tag 21 + 22) aufgeteilt. Die Tiere wurden auf Abteilbasis von Fachpersonal mit einem Gasgemisch von 35 % CO_2, 35 % N_2 und 30 % O_2 betäubt und anschließend über die Erstickung mit CO_2 euthanasiert. Um die Futteraufnahme sowie Verteilung der *Digesta* im GIT zu vereinheitlichen, wurde den Tieren 2 h vor der Schlachtung das Versuchsfutter für 1 h entzogen. Der Futterentzug, die Schlachtung und die Beprobung der Tiere erfolgten nach einem strikten Zeitplan auf Abteilbasis. Eine Stunde vor der Schlachtung erhielt das jeweilige Abteil das Versuchsfutter *ad libitum* zurück. Nach der Schlachtung wurden Kropf, Muskelmagen und die unteren 2/3 des Ileums (zwischen *Meckel-Divertikel* und 2 cm vor der *ileo-caeco-colic junction*) entnommen und an separaten Stationen beprobt. Zur Probengewinnung wurde der Ileum-Abschnitt mit ca. 4 °C kaltem ddH_2O gespült. Kropf und Muskelmagen wurden aufgeschnitten und der Inhalt mit Hilfe eines Spatels entleert. Die Proben von allen Tieren wurden auf Abteilbasis vereinigt und unmittelbar nach der Beprobung bei -18 °C eingefroren. Außerdem wurden von 4 zufällig ausgewählten Tieren je Abteil der rechte Fuß (oberhalb des Fersengelenkes) zur Bestimmung des Fußaschegehaltes entnommen. Die gefrorenen Proben wurden in das Institut für Nutztierwissenschaften der Universität Hohenheim transportiert. Es folgte die Gefriertrocknung (Christ) und das Mahlen der Proben mit einer Kugelmühle (Retsch) und Scheibenschwingmühle (Fritsch). Die gemahlenen Proben wurden bis zur Analyse im Institut kühl und trocken gelagert.

4.2.22 Analyse der Fußproben

Um eine Aussage über die Knochenmineralisierung der Versuchstiere zu treffen, wurde der Aschegehalt der Fußknochen bestimmt. Die entnommenen Füße wurden mit einem Skalpell sauber am Fersengelenk abgetrennt. Die Fußproben wurden mit ddH_2O gesäubert und für 72 h bei 103 °C in einem Wärmeschrank (VWR) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend gewogen. Bis zum Veraschen wurden die Proben in einem Exikator mit Silicagel gelagert. Die getrockneten Füße wurden in einem Muffelofen (Nabertherm) bei 600 °C für 48 h verascht (Aufheißphase 7 h, 600 °C 48 h, Abkühlphase 10 h) und anschließend gewogen.

4.2.23 Mineralstoffanalyse

Die Bestimmung der Nährstoffkonzentrationen aller Futter- und *Digesta*-Proben erfolgte nach den offiziellen Methoden des deutschen Verbandes Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA). Die Ca-, tP- und Ti-Konzentrationen wurden mit einer modifizierten Methode nach Boguhn et al. (2009) bestimmt.

Kurz zusammengefasst: 20 ml Schwefelsäure und 2,5 ml Salpetersäure wurden zu 0,4 g der Proben gegeben. Die Lösungen wurden für 30 min von 100 °C auf 200 °C in einem Block-Verdau-System (Behr Labor-Technik) erhitzt. Nach Abkühlung auf 100 °C wurden 2,5 ml Salpetersäure zugeführt und die Proben erst auf 225 °C, dann auf 300 °C für 75 min erhitzt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit ddH_2O auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und filtriert. Die Quantifizierung Ca-, P- und Ti-Konzentrationen erfolgte mit der Hilfe eines optischen Emissionsspektrometer mit induktiv gekoppelten Plasma (VISTA PRO, Varian Inc.) anhand der spezifischen Wellenlängen der Elemente nach Shastak et al. (2014).

4.2.24 Myo-Inositol-Analyse

Für die MI-Analyse wurden die Futter- und *Digesta*-Proben ohne vorherige Aufreinigung derivatisiert. Hierzu wurde eine Derivatisierung in zwei Schritten, bestehend aus Oximation und Silanisierung nach Sommerfeld et al. (2018) durchgeführt. Die anschließende Messung der MI-Konzentration erfolgte mit Hilfe einer Gaschromatographie gekoppelt an einen Massenspektrometer (GC-MSD) der Firma Agilent (5977A). Als interner Standard diente deuterisiertes MI.

4.2.25 Extraktion von Inositolphosphat-Isomeren

Die Extraktion der $InsP_x$ aus den *Digesta*- und Futterproben des Tierversuches erfolgte analog zur Extraktion im *in vitro*-Modell (siehe 4.2.18) mit Abwandlung der eingesetzten Volumina der Extraktionslösung und der Probemenge. Es wurden insgesamt 100 mg der *Digesta*- bzw. Futterproben in einem 10 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 1 ml der Extraktionslösung (0,2 M EDTA

und 0,1 M NaF, pH 8,0) versetzt. Außerdem wurde das Pellet der Proben nach der ersten Zentrifugation in 0,5 ml (statt 5 ml) resuspendiert.

4.2.26 Inositolphosphat-Analytik

Mit Hilfe der *High Pressure Ion Chromatography* (HPIC) wurden in diesem Projekt die verschiedenen $InsP_x$ analysiert, die bei dem Abbau von $InsP_6$ entstanden sind. Bei der HPIC handelt es sich um eine spezielle Form der *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC), bei der eine Ionenaustauscher-Säule verwendet wird.

Am Institut für Nutztierwissenschaften wurden alle Proben des *in vitro*-Modells und des Tierversuches analysiert. Die extrahierten $InsP_x$ wurden mit Hilfe einer HPLC (Thermo Scientific) inklusive Nachsäulenderivatisierung (ICS-3000) nach Philippy und Bland (1988) quantifiziert. Über einen starken Ionenaustauscher (HPLC-Säule: Dionex Carbo Pac PA 20 von Thermo Scientific) wurden die verschiedenen Abbauprodukte des $InsP_6$ ($InsP_{2-6}$) und deren Positionsisomere aufgetrennt. Enantiomere können infolge von identischen Retentionszeiten nicht differenziert werden. Als Laufmittel diente ddH_2O und HCl. Zur Nachsäulenderivatisierung wurde eine Lösung mit 200 mM Perchlorsäure und 1 % (w/v) Eisennitrat verwendet, wodurch die separierten $InsP_x$-Derivate bei einer Wellenlänge von 290 nm quantifiziert werden konnten. Zur Identifizierung der $InsP_x$ wurde eine Referenzprobe mit bekannten $InsP_x$ verwendet.

Im Labor der Firma EW Nutrition GmbH wurden die $InsP_x$ bei der Untersuchung des Phytatabbauweges nach Blaabjerg et al. (2010b) analysiert. Statt dem Laufmittel HCl wurde Methansulfonsäure verwendet. Dies hat den Vorteil, dass es keinen Drift der Basislinie gibt. Außerdem wurde ein Hitachi Chromaster HPLC-System (VWR) mit einer Nachsäulenderivatisierung von ASI verwendet. Zum Auftrennen der $InsP_x$ wurde die HPLC-Säule: Dionex Carbopac PA-100 (Thermo Scientific) verwendet.

Das Detektionslimit wurde definiert als *Signal:Noise*-Verhältnis von 3:1. Für $InsP_{3-4}$ beträgt das Limit 0,1 µmol/g TM, für $InsP_5$ sowie $InsP_6$ 0,05 µmol/g TM. Alle gemessenen Futterproben und Proben aus dem *in vitro-Modell* wurden in Drei- bis Vierfachbestimmung analysiert. Die *Digesta*-Proben wurden als Doppelbestimmung gemessen. Der Mittelwert der $InsP_x$-Konzentrationen wurde auf Basis der TM berechnet. Bei den $InsP_x$-Konzentrationen der *Digesta*-Proben wurde der Mittelwert gebildet, wenn bei mindestens 5 der 8 Wiederholungen eine Detektion der jeweiligen $InsP_x$-Konzentration möglich war. Wenn bei 1-4 Wiederholungen eine Konzentration nachweisbar war, wurde die Konzentration als <LOQ ausgewiesen. Waren alle Wiederholungen unterhalb des Detektionslimits, wurden die jeweiligen $InsP_x$ als nicht detektierbar (n.d.) gewertet.

4.2.27 Kalkulation und Statistik

Leistungsdaten wie die mittlere tägliche Gewichtszunahme (ADG), Futteraufnahme (ADFI) sowie das Verhältnis von Gewichtszunahme und Futteraufnahme (G:F) wurden für die zweite Phase des Tierversuches (Tag 11-21) auf Abteilbasis bestimmt. Tierverluste wurden berücksichtigt, indem die Kalkulation von ADG auf der Summe der Tiertage je Abteil basierte.

Die Kalkulation der prozentualen $InsP_6$-, Ca- und P-Verdaulichkeit wurde entsprechend der gemessenen Konzentrationen der Futter- und *Digesta*-Proben unter Berücksichtigung des unverdaulichen Markers Titandioxid (TiO_2) durchgeführt. Folgende generell akzeptierte Gleichung wurde verwendet:

$$y(\%) = 100 - 100 \times \left(\frac{Ti\ im\ Futter\left(\frac{g}{kg}TM\right)}{Ti\ in\ \text{der}\ Digesta\left(\frac{g}{kg}TM\right)} \times \frac{X\ in\ \text{der}\ Digesta\ (\frac{g}{kg}TM)}{X\ im\ Futter\ (\frac{g}{kg}TM)}\right)$$

X= $InsP_6$, P oder Ca

Alle statistisch belastbare Daten, wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*proc mixed*) der Software SAS für Windows (Version 9.3; SAS Institute Inc.) statistisch ausgewertet. Korrelationen wurden über das CORR Prozedere kalkuliert. Die Daten wurden als *L*east-Squares (*LS)-means* ± *Standard Deviation* (SD) dargestellt. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der kleinsten Quadrate wurden bei $P<0,05$ als statistisch signifikant ausgewiesen.

5 Ergebnisse

5.1 Biochemische Charakterisierung der Wildtyp-Phytasen

Vor der Herstellung der Rekombinationsbibliothek wurden die biochemischen Eigenschaften der WT-Phytasen analysiert, die miteinander rekombiniert werden sollten. Hierzu wurden die Phytasegene aus den 8 unterschiedlichen Organismen in *B. subtilis* rekombinant hergestellt und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 4.2.9). Danach wurden die aufgereinigten WT-Phytasen hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivität, ihrem pH-Aktivitätsprofil, ihrer pH- und Temperaturstabilität sowie ihrer Pepsinresistenz charakterisiert. Des Weiteren wurde der $InsP_6$-Abbau der WT-Phytasen bei zwei unterschiedlichen pH-Werten (3,0 und 5,5) untersucht und die dabei entstandenen Abbauprodukte identifiziert.

Die ermittelten spezifischen Aktivitäten der untersuchten Phytasen lagen bei einem pH-Wert von 5,5 in einem Bereich zwischen 446 U/mg und 1104 U/mg. Die Phytase aus dem Organismus *Y. intermedia* verfügte über die höchste gemessene Aktivität. Im direkten Vergleich konnte die WT-Phytase aus *O. proteus* unter identischen Reaktionsbedingungen mit 446 U/mg weniger als die Hälfte Pi pro Minute freisetzen. Damit zeigte *O. proteus* die nummerisch geringste spezifische Aktivität, gefolgt von der Phytase aus *B. sp. GC21* mit 476 U/mg. Alle anderen WT-Phytasen besaßen eine spezifische Aktivität von mindestens 711 U/mg.

Bei einem pH-Wert von 3,0 nahmen die spezifischen Aktivitäten der WT-Phytasen aus *O. proteus*, *Y. intermedia* und *C. braakii* gegenüber ihrer Aktivität bei pH 5,5 zu. Die WT-Phytase aus *C. braakii* übertraf mit 1414 U/mg die Aktivität der *Y. intermedia*-Phytase (1313 U/mg) und zeigte bei einem pH-Wert von 3,0 die höchste gemessene Aktivität. Im Gegensatz dazu zeigte die WT-Phytase aus *D. paradisiaca* bei einem pH-Wert von 3,0 eine sehr geringe spezifische Aktivität von 24 U/mg.

Die ermittelten pH-Aktivitätsprofile der meisten WT-Phytasen zeigten hohe Übereinstimmungen und bewegten sich in einem pH-Bereich von 2,5-5,5. Die Restaktivität, bezogen auf das pH-Optimum der Phytasen, lag hier bei mindestens 50 %. Das pH-Aktivitätsprofil der WT-Phytasen aus *D. paradisiaca* (3,5-6,0) und *E. sp. biph 1* (3,0-6,0) war hingegen leicht in Richtung neutralen pH-Bereich verschoben. Die meisten der getesteten Phytasen zeigten ihre maximale katalytische Aktivität bei einem pH-Wert von 4,5. Nur die WT-Phytasen aus *C. braakii* und *O. proteus* besaßen ein pH-Optimum bei einem pH-Wert von 4,0.

Bezüglich der Toleranz gegenüber hohen Temperaturen zeigten zwei WT-Phytasen bei Temperaturen über 60 °C eine Restaktivität von mindestens 50 %. Neben der Phytase aus *O. proteus* mit 60,4 °C verfügte die WT-Phytase aus *H. alvei* mit 62,3 °C über den nummerisch höchsten IT-50. Die WT-Phytase aus *E. sp. biph 1* zeigte mit einem IT-50 von 55,0 °C eine geringe Hitzetoleranz.

Um die Widerstandsfähigkeit der WT-Phytasen gegenüber proteolytischen Enzymen zu testen, wurden die Phytasen für 30 min bei einem pH-Wert von 2,5 mit Pepsin inkubiert (siehe 4.2.16). Dabei zeigten die WT-Phytasen aus *E. coli*, *H. alvei*, *O. proteus* und *Y. intermedia* mit mindestens 86 % Restaktivität eine hohe Resistenz gegenüber Pepsin. Bei den WT-Phytasen aus *C. braakii*, *B. sp. GC21*, *D. paradisiaca* und *E. sp. biph 1* wurde die Phytaseaktivität hingegen negativ beeinflusst. Die Inkubation mit Pepsin führte hier zu einer Restaktivität von 6-33 %. Die geringste Aktivität konnte bei der WT-Phytase aus *E. sp. biph 1* nachgewiesen werden. Alle ermittelten biochemischen Eigenschaften der WT-Phytasen sind in der Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Biochemische Charakterisierung der Wildtyp-Phytasen

Organismus	Spezifische Aktivität pH 5,5 U/mg Protein	Spezifische Aktivität pH 3,0 U/mg Protein	pH-Aktivitätsprofil pH	pH-Optimum pH	IT-50 °C	pH 2,5 Resistenz %	Pepsin-Resistenz %
B. sp. GC21	476	442	2,5-5,5	4,5	54,0	79	8
C. braakii	925	1414	3,0-5,5	4,0	55,2	50	33
D. paradisiaca	711	24	3,5-6,0	4,5	49,0	15	17
E. coli	889	802	2,5-5,5	4,5	57,0	101	122
E. sp. biph 1	848	717	3,0-6,0	4,5	55,0	22	6
H. alvei	731	727	2,5-5,5	4,5	63,2	96	99
O. proteus	446	823	2,5-5,5	4,0	60,4	110	118
Y. intermedia	1104	1313	2,5-5,5	4,5	52,1	87	86

Übersicht der ermittelten biochemischen Eigenschaften der WT-Phytasen im Vergleich. Die spezifische Aktivität (U/mg Protein) ist definiert als Menge Pi (µmol) die pro Minute aus 5,1 mM Na-Phytat, gelöst in einem 50 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5) je mg Protein freigesetzt wird (AOAC 2000). PH-Aktivitätsprofil: Definiert als pH-Spektrum, bei der die Phytase in Relation zu ihrem pH-Optimum, eine Restaktivität von mindestens 50 % besitzt; IT-50: Maß für die Hitzetoleranz des Proteins. Definiert als Temperatur, bei der die Phytase 50 % ihrer Aktivität im Vergleich zu einer Inkubation bei Raumtemperatur (25 °C) aufweist. Als pH 2,5- und Pepsin-Resistenz versteht man die Restaktivität der Phytase, unter Verwendung eines Glycin-HCL Puffers (pH 2,5) ohne bzw. mit Pepsin-Zugabe. Als Referenz wurde die Phytaseaktivität unter Standardbedingungen nach AOAC (2000) herangezogen.

Zur weiteren Charakterisierung der WT-Phytasen wurde der $InsP_6$-Abbau untersucht, indem die Konzentrationen der spezifischen Abbauprodukte zu verschiedenen Zeitpunkten der $InsP_6$-Hydrolyse bestimmt wurden. Die $InsP_6$-Hydrolyse wurde sowohl bei einem pH-Wert von 3,0 sowie 5,5 untersucht. Der Enzymeinsatz erfolgte auf Basis der zuvor bestimmten spezifischen Aktivitäten, so dass die Phytasen bei beiden pH-Werten aktivitätsgleich eingesetzt werden konnten. Der Na-Phytat-Abbau erfolgte analog zur Phytatreaktion (siehe 4.2.12) mit einer kleinen Modifikation. Die Reaktion wurde nicht nach 30 min gestoppt, sondern nach 10, 20, 40, 60, 80 oder 100 min. Im Anschluss erfolgte die Analyse der $InsP_x$ mittels HPIC-Methode (siehe 4.2.25).

Trotz der vergleichbaren Phytaseaktivität wurden vor allem die Isomere $InsP_{2-4}$ bei einem pH-Wert von 3,0 deutlich schneller abgebaut (siehe Abbildung 8). Dies konnte bei allen getesteten Phytasen, mit Ausnahme der *D. paradisiaca*-Phytase, beobachtet werden, da diese bei einem pH-Wert von 3,0 nahezu inaktiv ist.

Bei einem pH-Wert von 5,5 zeigten alle 6-Phytasen eine hohe Akkumulation des Abbauproduktes $Ins(1,2,5,6)P_4$, welches auch nach einer Inkubationszeit von 100 min nicht vollständig abgebaut werden konnte. Betrachtet man den $InsP_6$-Abbau der WT-Phytase aus *O. proteus*, so konnte das $Ins(1,2,5,6)P_4$ bei einem pH-Wert von 3,0 nach 60 min vollständig abgebaut werden. Im Gegensatz dazu machte das $Ins(1,2,5,6)P_4$ bei einem pH-Wert von 5,5 nach 60 min Inkubation insgesamt 19,4 % der kumulierten $InsP_x$-Konzentrationen aus.

Bei einem pH-Wert von 3,0 konnte die *O. proteus*-Phytase das $InsP_6$ nach 100 min Inkubationszeit vollständig bis zum $InsP_2$ dephosphorylieren, während bei einem pH-Wert von 5,5 noch hohe $Ins(1,2,5,6)P_4$-Konzentrationen nachweisbar waren (siehe Abbildung 8). Aufgrund der hohen Akkumulation des $Ins(1,2,5,6)P_4$ bei dem pH-Wert 5,5 fielen die Unterschiede zwischen den getesteten Phytasen hier weniger stark aus als bei einem pH-Wert von 3,0.

Betrachtet man den $InsP_6$-Abbau bei pH 3,0 so wurde das $Ins(1,2,5,6)P_4$ von allen 6-Phytasen nach einer Inkubation von 100 min vollständig abgebaut. Unterschiede zwischen verschiedenen WT-Phytasen lassen sich hier in der Abbaugeschwindigkeit der $InsP_x$ und ihrer Präferenz für die gebildeten $InsP_4$-Isomere erkennen.

Die WT-Phytasen aus *E. coli*, *E. sp. biph 1* und *C. braakii* akkumulierten das $Ins(1,2,5,6)P_4$ im Vergleich zu den anderen WT-Phytasen länger. So waren hier die gemessenen $Ins(1,2,5,6)P_4$-Konzentrationen nach 60 min höher als bei den anderen WT-Phytasen. Außerdem konnten nach 100 min Inkubation mehrere $InsP_3$-Isomere nachgewiesen werden. Dies war bei den WT-Phytasen aus *B. sp.GC21*, *H. alvei*, *O. proteus* sowie *Y. intermedia* nicht der Fall. Den effizientesten $InsP_6$-Abbau in diesem Versuch zeigte die WT-Phytase aus *O. proteus*. Hier wurde nach 100 min die niedrigste $InsP_2$- und höchste $InsP_1$/P-Konzentration gemessen.

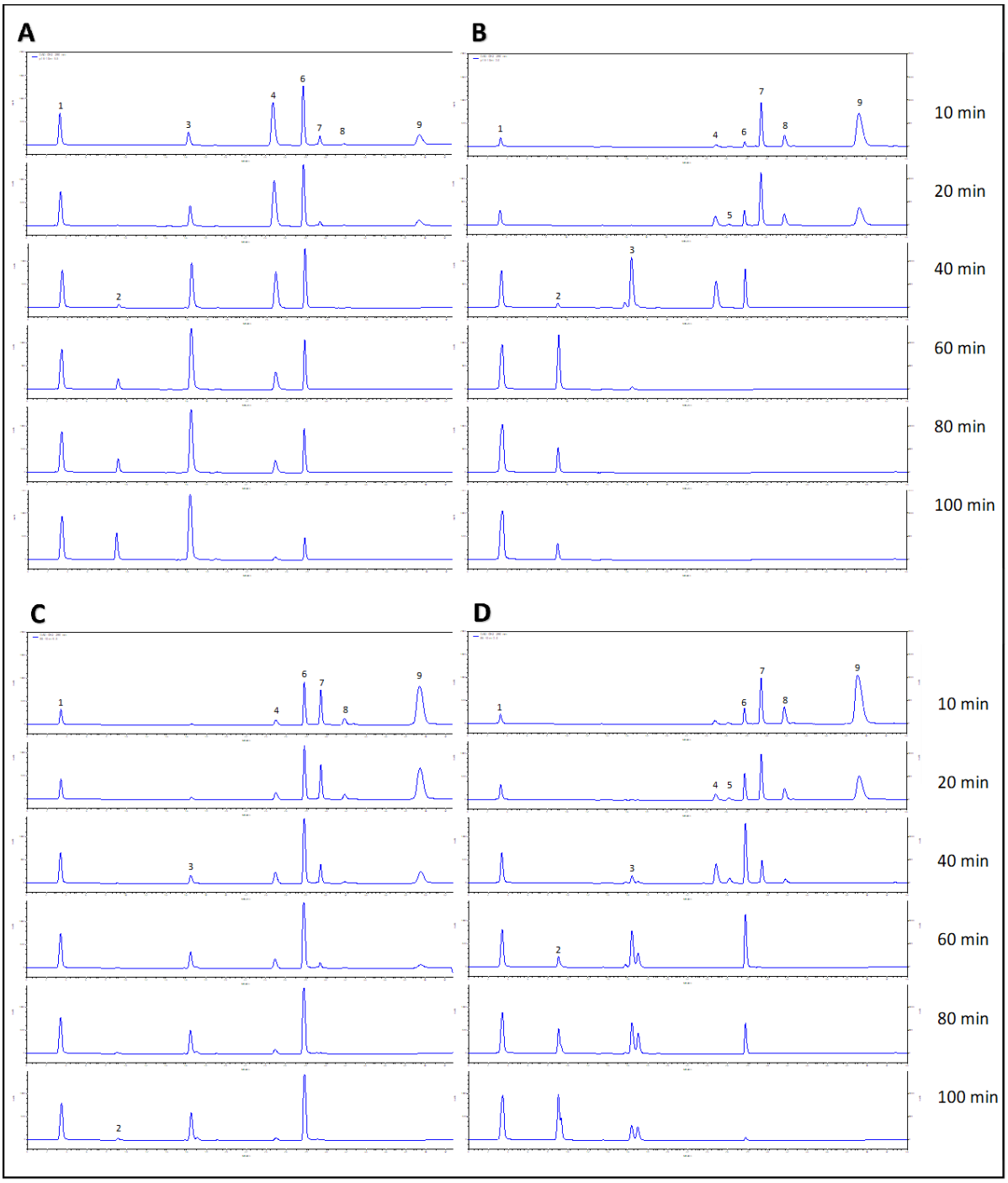

Abbildung 8: Phytatabbau der Wildtyp-Phytasen bei pH 3,0 und pH 5,5.

Die Chromatogramme A) bis D) zeigen den Phytatabbau und die Bildung verschiedener Abbauprodukte von zwei der insgesamt 8 untersuchten WT-Phytasen. A) und B) zeigen den Phytatabbau der O. proteus WT-Phytase unter Verwendung eines Glycin-HCL Puffers bei pH 3,0 (A) sowie eines Na-Acetatpuffers mit einem pH von 5,5 (B). In C) und D) ist der Phytatabbau der WT-Phytase aus C. braakii dargestellt (C=pH 3,0; D=pH 5,5).

Die Phytasen wurden basierend auf ihrer jeweiligen spezifischen Aktivität bei pH 3,0 und pH 5,5 aktivitätsgleich eingesetzt. Die Phytasereaktion wurde zu 5 unterschiedlichen Zeitpunkten (10; 20; 40; 60; 80 und 100 min) gestoppt und mittels HPIC analysiert. Die nummerierten Peaks geben die identifizierten $InsP_X$ an. $InsP_{1x}/P=1$, $InsP_{2x}=2$, $Ins_{3x}=3$, $Ins(1,2,3,4)P_4=4$, $Ins(1,2,4,5)P_4=5$, $Ins(1,2,5,6)P_4=6$, $Ins(1,2,4,5,6)P_5=7$, $Ins(1,2,3,4,5)P_5=8$, $InsP_6=9$.

Mit Ausnahme der 3-Phytase aus *D. paradisiaca* unterscheiden sich die gebildeten Hauptabbauprodukte der getesteten Phytasen nicht voneinander. Aufgrund der Stereospezifität der *D. paradisiaca*-Phytase konnten hier hohe Konzentrationen Ins(1,2,4,5,6)P_5 gemessen werden. Die 6-Phytasen bildeten, wie zu erwarten, hauptsächlich das Ins(1,2,3,4,5)P_5.

Einen interessanten Unterschied zwischen den untersuchten 6-Phytasen zeigte sich in den Konzentrationen der Nebenabbauprodukte. Bei einigen WT-Phytasen konnten hohe Ins(1,2,3,4)P_4-Konzentrationen gemessen werden, während andere fast ausschließlich das Ins(1,2,5,6)P_4 bildeten. Hohe Ins(1,2,3,4)P_4-Konzentrationen zeigten die WT-Phytasen aus *O. proteus, H. alvei, Y. intermedia* und *B. sp. GC21*. Die WT-Phytasen *aus E. coli, E. sp. biph 1* und *C. braakii* zeigten hingegen eine Präferenz für das Ins(1,2,5,6)P_4 in ihrem $InsP_6$-Abbau. Dafür bildeten sie mehr $InsP_3$-Isomere im Vergleich zu den WT-Phytasen aus *O. proteus, H. alvei, Y. intermedia* und *B. sp. GC21* (siehe Abbildung 8).

Die meisten WT-Phytasen verfügten über eine hohe Aktivität sowohl bei einem pH-Wert von 3,0 als auch bei einem pH-Wert von 5,5. Das Na-Phytat konnte bei einem pH-Wert von 3,0 allerdings effizienter dephosphoryliert werden. Sechs der WT-Phytasen zeigten ein pH-Optimum von 4,5 und verfügten über ein breites pH-Aktivitätsprofil. Vier der 8 WT-Phytasen zeigten mit einer Pepsin- und pH-2,5- Resistenz > 86 % eine hohe Stabilität unter anspruchsvollen Reaktionsbedingungen, wie sie im Magen von Nichtwiederkäuern auftreten können. Außerdem konnten Unterschiede bei der Bildung verschiedener $InsP_x$ zwischen einigen WT-Phytasen beobachtet werden. Die ermittelten biochemischen Daten der WT-Phytasen dienten im weiteren Verlauf der Arbeit als Referenzwerte zur Einordnung der Leistungsfähigkeit der neu erzeugten Hybrid-Phytasen.

5.2 Rekombination der *Biobricks*

Nach der biochemischen Charakterisierung der WT-Phytasen erfolgte die Herstellung der Rekombinationsbibliothek mit Hilfe der *Golden Gate*-Methode (siehe 4.2.3). Dazu wurden aus den 8 WT-Phytasegenen je 3 *Biobricks* via PCR hergestellt, die über spezifische Enden alle miteinander verbunden werden konnten. Die Rekombinationsbibliothek verfügte insgesamt über eine Komplexität von 516, was die Anzahl der möglichen Kombinationen der enthaltenen *Biobricks* widerspiegelt.

Ein wichtiges Zwischenergebnis stellte die Kontrolle der Rekombinationsbibliothek dar, bei der überprüft wurde, ob die Rekombination der *Biobricks* wie geplant verlaufen ist. Hierzu wurde die Plasmid-DNA von 15 zufällig ausgewählten Kolonien sequenziert, in die zuvor die Rekombinationsbibliothek transformiert wurde. Anhand der AS-Abfolge der enthaltenen Phytasegene konnte die Rekombination der einzelnen *Biobricks* nachvollzogen werden (siehe Tabelle 26).

Aus den 15 sequenzierten Phytasegenen konnten insgesamt 14 unterschiedliche Hybrid-Phytasen identifiziert werden. Die Variante EYH wurde in zwei der isolierten Plasmide wiedergefunden. Die

Abkürzung der Varianten basiert auf den Anfangsbuchstaben der Organismen, aus denen die *Biobricks* stammen. Insgesamt konnten mindestens 2 *Biobricks* aus jeder der 8 eingesetzten WT-Phytasen wiedergefunden werden. Außerdem konnten in den Sequenzen der Hybrid-Phytasen keine ungewollten Mutationen identifiziert werden.

Tabelle 26: Sequenzierungsergebnisse der 15 zufällig ausgewählten Kolonien der transformierten Rekombinationsbibliothek.

Probenname	Variante	*Biobrick* 1	*Biobrick* 2	*Biobrick* 3
K1	EYD			
K2	EYH			
K3	YDO			
K4	BEO			
K5	EYH			
K6	DHEn			
K7	DDB			
K8	EHB			
K9	HEnEn			
K10	HHD			
K11	BOD			
K12	HBE			
K13	OBO			
K14	BYC			
K15	CEH			

Die Abkürzung der Varianten setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der WT-Phytasen zusammen, aus denen der jeweilige Biobrick stammt. B=B sp. GC21 (grün); C=C. braakii (orange); D=D. paradisiaca (violett); E=E. coli (rot); En=E. sp. biph 1 (schwarz); H=H. alvei (gelb); O=O. proteus (grau); Y=Y. intermedia (blau).

5.3 Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek nach Phytaseaktivität

Nach der Überprüfung der Rekombinationsbibliothek erfolgte die systematische Durchmusterung nach aktiven Phytasen. Hierzu wurden insgesamt 3840 *B. subtilis* Kolonien in 384-*well* Mikrotiterplatten kultiviert und die Pi-Freisetzung der exprimierten Phytasen mittels FeMo-Assay bestimmt. Die Messung der Phytaseaktivität erfolgte mit einer Hälfte der Proben bei pH 3,0. Die andere Hälfte wurde bei einem pH-Wert von 5,5 analysiert.

Im Gegensatz zu der Messung bei dem pH-Wert 5,5 konnten bei einem pH-Wert von 3,0 deutlich mehr aktive Phytasen identifiziert werden. Von den 1920 analysierten Proben wurden 71,2 % als aktiv eingestuft. Davon setzten 31 Proben eine Pi-Konzentration von mindestens 6,0 mM frei und zeigten die im Vergleich höchsten gemessenen Volumenaktivitäten. Bei einem pH-Wert von 5,5 konnten nur 51,4 % der Proben als aktiv eingestuft werden. Nichtsdestotrotz zeigten 35 Proben eine Pi-Konzentration von mindestens 6,0 mM. Die hohen Volumenaktivitäten der insgesamt 66 Proben konnten nach einer erneuten Kultivierung bestätigt werden. Danach erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA und die Proben wurden sequenziert.

Aus den 35 Proben, die bei einem pH-Wert von 5,5 ausgewählt wurden, konnten 21 Hybrid-Phytasen und 14 WT-Phytasen identifiziert werden (Tabelle 27). Auffällig war, dass fast die Hälfte der identifizierten WT-Phytasen aus *D. paradisiaca* stammten. Unter den 21 Hybrid-Phytasen konnten 14 unterschiedliche Rekombinationen nachgewiesen werden. Die meisten Hybrid-Phytasen bestanden aus den *Biobricks* zweier unterschiedlicher Organismen. Sechs der Hybrid-Phytasen setzten sich hingegen aus drei Organismen zusammen (OBH, OYB, CYO, OYH und OCB). Insgesamt 10 Hybrid-Phytasen verfügten über mindestens einen *Biobrick* aus *H. alvei* und *O. proteus*. Die Variante OHH wurde in 5 Proben wiedergefunden, andere Hybrid-Phytasen kamen höchstens doppelt vor. Interessant ist, dass die *Biobricks* aus *E. coli* nur in Verbindung mit *Biobricks* aus *C. braakii* auftraten. Außerdem konnten bei pH 5,5 keine Hybrid-Phytasen mit einem *Biobrick* aus *D. paradisiaca* oder *E. sp. biph 1* identifiziert werden.

Tabelle 27: Sequenzierungsergebnisse der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek nach aktiven Phytasen bei einem pH-Wert von 5,5.

Probenname	Variante	*Biobrick* 1	*Biobrick* 2	*Biobrick* 3
2M9	*B. WT*			
3M13	*B. WT*			
4M17	*B. WT*			
4O17	*B. WT*			
5F12	*B. WT*			
3K12	*D. WT*			
3A19	*D. WT*			
4G7	*D. WT*			
4O15	*D. WT*			
5M18	*D. WT*			
5C3	*D. WT*			
3C5	*D. WT*			
2F4	*Y. WT*			
5D16	*Y. WT*			
0I16	BHB			
1P17	CCE			
4E22	CYO			
2N5	ECC			
2A3	ECC			
4I18	HBB			
3A6	HHO			
4K17	OBH			
0B10	OBH			
0J11	OBO			
3F16	OCB			
2F3	OHH			
5H1	OHH			
2G3	OHH			
0N3	OHH			
5H5	OHH			
5K20	OHO			
3H4	OOH			
0O16	OOB			
2B7	OYB			
0E17	OYH			

Dargestellt sind die Biobricks der identifizierten Phytasen, die bei der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek bei einem pH von 5,5 über eine hohe Volumenaktivität verfügten. Die Abkürzung der Hybrid-Phytasen setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der WT-Phytasen zusammen, aus denen die jeweiligen Biobricks stammen: B=B sp. GC21 (grün); C=C. braakii (orange); D=D. paradisiaca (violett); E=E. coli (rot); En=E. sp. biph 1 (schwarz); H=H. alvei (gelb); O=O. proteus (grau); Y=Y. intermedia (blau).

Von den 31 sequenzierten Proben, die bei einem pH-Wert von 3,0 ausgewählt wurden, konnten 5 WT- und 26 Hybrid-Phytasen identifiziert werden (Tabelle 28). Im Gegensatz zu den Reaktionsbedingungen bei pH-Wert 5,5 wurde keine WT-Phytase aus *D. paradisiaca* gefunden. Außerdem konnten drei Varianten identifiziert werden, die aus einem *Biobrick* der *E. sp. biph 1*-Phytase bestanden (EnEE, OEnO und OEnH). Von den insgesamt 26 identifizierten Hybrid-Phytasen wurden 16 unterschiedliche Rekombinationen nachgewiesen. Sechs der Varianten konnten bereits bei einem pH-Wert von 5,5 identifiziert werden (CCE, ECC, HHO, OBH, OHO und OYH). Die Hälfte

der neu gefundenen Hybrid-Phytasen setzte sich aus drei unterschiedlichen Phytasegenen zusammen (HBO, OBH, OEnH, OHB und OYH).

Insgesamt konnten von den 66 sequenzierten Proben 24 unterschiedliche Hybrid-Phytasen identifiziert werden, welche über eine hohe Volumenaktivität (auf WT-Niveau) bei den pH-Werten 3,0 bzw. 5,5 verfügten. Unter Volumenaktivität versteht man die Menge Pi, die pro Minute je ml Probenvolumen freigesetzt wird. Angegeben wird die Volumenaktivität in U/ml.

Tabelle 28: Sequenzierungsergebnisse der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek nach aktiven Phytasen bei einem pH-Wert von 3,0.

Probenname	Variante	*Biobrick* 1	*Biobrick* 2	*Biobrick* 3
3I13	*B. WT*			
2G10	*E. WT*			
3B5	*H. WT*			
4D19	*H. WT*			
1F24	*Y. WT*			
3A1	BYB			
1N24	BYB			
2C7	CEE			
3E8	ECC			
3E9	ECE			
4J2	ECE			
3O14	EnEE			
5P8	HBH			
4E19	HBH			
1F21	HBH			
1B2	HBO			
2H21	HHB			
2H23	HHB			
3O21	HHB			
3A17	HHO			
1C18	HOH			
1B10	OBH			
5N16	OBH			
3E4	OEnH			
1B7	OEnO			
1J14	OHB			
5N19	OHB			
5J1	OHB			
1B3	OHO			
1C15	OHO			
1G1	OYH			

Dargestellt sind die Biobricks der identifizierten Phytasen, die bei der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek bei einem pH von 3,0 über eine hohe Volumenaktivität verfügten. Die Abkürzung der Hybrid-Phytasen setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der WT-Phytasen zusammen, aus denen die jeweiligen Biobricks stammen: B=B sp. GC21 (grün); C=C. braakii (orange); D=D. paradisiaca (violett); E=E. coli (rot); En=E. sp. biph 1 (schwarz); H=H. alvei (gelb); O=O. proteus (grau); Y=Y. intermedia (blau).

5.4 Biochemische Charakterisierung der Hybrid-Phytasen

Die Hybrid-Phytasen wurden analog zu den WT-Phytasen mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften untersucht. Bei allen verwendeten biochemischen Assays wurden die WT-Phytasen als Referenzen herangezogen. Die ermittelten biochemischen Daten der charakterisierten Hybrid-Phytasen sind in der Tabelle 29 den ermittelten Daten der WT-Phytasen gegenübergestellt.

Die Varianten ECE, CCE und ECC verfügten bei einem pH-Wert von 5,5 über eine spezifische Aktivität von 832-936 U/mg. Somit liegen die Varianten in dem Bereich der WT-Phytasen aus *E. coli* (889 U/mg) und *C. braakii* (925 U/mg). Eine vergleichbare Aktivität zur WT-Phytase aus *O. proteus* (446 U/mg) zeigte die Variante OYB mit 447 U/mg. Die sequenziell sehr ähnliche Variante OYH verfügte mit 526 U/mg ebenfalls über eine vergleichsweise geringe spezifische Aktivität. Die Aktivität der anderen Varianten bewegte sich in einem Bereich von 550 U/mg (OHB) bis 781 U/mg (HBH).

Im Vergleich zu den Messungen bei dem pH-Wert 5,5 zeigten die beiden Varianten OYH und OYB bei einem pH-Wert von 3,0 eine leicht geringere spezifische Aktivität. Alle anderen Hybrid-Phytasen zeigten höhere Aktivitäten. Die Varianten CCE, ECC, ECE und OHH kommen bei einem pH-Wert von 3,0 auf eine Aktivität von 1033-1414 U/mg. Die nummerisch höchste Aktivität zeigte die Variante ECC mit 1414 U/mg. Damit verfügt die Variante über eine vergleichbare Aktivität wie die WT-Phytase aus *C. braakii*. Im Vergleich zu den WT-Phytasen aus *H. alvei* und *O. proteus* führte die Rekombination der Varianten OOH und OHH zu einer nummerisch höheren spezifischen Aktivität von 102-365 U/mg bei pH 3,0.

Das pH-Aktivitätsprofil von 8 der insgesamt 14 untersuchten Hybrid-Phytasen lag in einem Bereich von 2,5-5,5 und entsprach somit dem pH-Aktivitätsprofil der meisten WT-Phytasen. Die Varianten HHO und OHH zeigten mit einem pH-Aktivitätsprofil von 2,0-5,5 eine höhere Aktivität im sauren Milieu als die WT-Phytasen aus *H. alvei* und *O. proteus*. Eine höhere Aktivität bei einem pH-Wert von 6,0 zeigte die Variante OYB (2,5-6,0). Veränderungen des pH-Wertes tolerierte die Variante HBH mit einem pH-Aktivitätsprofil von 2,5-4,0 weniger stark. Entsprechend der Unterschiede im pH-Aktivitätsprofil zeigten einige Varianten ebenfalls ein verändertes pH-Optimum gegenüber den WT-Phytasen aus denen sie bestehen. Die Varianten HOH, OHB und ECE zeigten ihre höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 3,5. OYB kam hingegen auf ein pH-Optimum von 5,0. Der Großteil der Hybrid-Phytasen verfügte über ein pH-Optimum von 4,0.

Die Hälfte der Hybrid-Phytasen zeigten eine hohe Pepsinresistenz entsprechend der WT-Phytasen aus *E. coli*, *H. alvei* und *O. proteus*. Die Varianten OHO, OHH, OOH, HOH, OYB, ECE und ECC besaßen nach der Inkubation mit Pepsin eine Restaktivität von mindestens 95 %. Die höchsten Aktivitätsverluste konnten bei den Hybrid-Phytasen OBH, BHB und HBH beobachtet werden. Die Varianten OBH und BHB wurden bei einem pH-Wert von 2,5 von Pepsin vollständig inhibiert. Eine Restaktivität von 20 % zeigte die Variante HBH. Allen Varianten ist gemein, dass sie aus *Biobricks*

der *B. sp. GC21*-Phytase bestehen, welche ebenfalls über eine geringe Resistenz gegenüber Pepsin verfügte (8 % Restaktivität). Nur die Varianten OHB und OYB zeigten eine hohe Resistenz gegenüber Pepsin und verfügen gleichzeitig über eine Sequenz aus der WT-Phytase von *B. sp. GC21*.

Die Variante CCE zeigte nach der Pepsininkubation eine Restaktivität von 60 %. Somit führte die Rekombination zu einer höheren Pepsinresistenz gegenüber der WT-Phytase aus *C. braakii* (33 %). Die sequenziell sehr ähnlichen Varianten ECC und ECE verfügten hingegen über eine Restaktivität von mindestens 95 %.

Die Hitzetoleranz einiger Hybrid-Phytasen konnte durch die Rekombination der *Biobricks* erhöht werden. So zeigten die Varianten OHH, HHO und OHO gegenüber der WT-Phytase aus *H. alvei* (63,2 °C) einen um 0,9-2,2 °C höheren IT-50. Mit einem Wert von 65,4 °C war der IT-50 der Variante OHO im Vergleich zu allen anderen untersuchten Phytasen am höchsten. Eine geringe Hitzetoleranz besaßen hingegen die Varianten CCE, ECC und ECE mit einem IT-50 von 51,3-53,9 °C. Hier hatte sich Wert gegenüber den WT-Phytasen aus *C. braakii* (55,2 °C) und *E. coli* (57 °C) reduziert.

Tabelle 29: Vergleich der biochemischen Eigenschaften von Hybrid- und Wildtyp-Phytasen.

Organismus	Spez. Aktivität pH 5,5 U/mg Protein	Spez. Aktivität pH 3,0 U/mg Protein	pH-Aktivitätsprofil pH	pH-Optimum pH	IT-50 °C	pH 2,5 Resistenz %	Pepsin-Resistenz %
WT-Phytasen							
B. sp. GC21	476	442	2,5-5,5	4,5	54,0	79	8
C. braakii	925	1414	3,0-5,5	4,0	55,2	50	33
D. paradisiaca	711	24	3,5-6,0	4,5	49,0	15	17
E. coli	889	802	2,5-5,5	4,5	57,0	101	122
E. sp. biph 1	848	717	3,0-6,0	4,5	55,0	22	6
H. alvei	731	727	2,5-5,5	4,5	63,2	96	99
O. proteus	446	823	2,5-5,5	4,0	60,4	110	118
Y. intermedia	1104	1313	2,5-5,5	4,5	52,1	87	86
Hybrid-Phytasen							
BHB	567	614	2,5-4,0	4,0	55,9	77	0
CCE	930	1033	3,0-6,0	4,0	51,3	71	60
ECC	936	1414	2,5-5,5	4,5	51,8	97	95
ECE	832	1065	2,5-5,5	3,5	53,9	104	99
HBH	781	845	2,5-5,5	4,5	58,3	105	20
HHO	577	747	2,0-5,5	4,5	64,4	107	76
HOH	581	670	2,5-5,5	3,5	59,9	99	97
OBH	678	821	3,0-5,5	4,0	60,0	73	0
OHB	550	806	2,5-5,5	3,5	61,9	103	84
OHH	692	1092	2,0-5,5	4,5	64,3	112	105
OHO	623	727	2,5-5,5	4,0	65,4	111	103
OOH	562	925	2,5-5,5	4,0	62,3	109	106
OYB	447	434	2,5-6,0	5,0	57,5	117	95
OYH	526	515	2,5-5,5	4,0	59,2	107	90

Übersicht der ermittelten biochemischen Eigenschaften der Wildtyp (WT)-Phytasen im Vergleich zu den Hybrid-Phytasen. Die spezifische Aktivität (U/mg Protein) ist definiert als Menge Pi (µmol) die pro Minute aus 5,1 mM Na-Phytat, gelöst in einem 50 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5) je mg Protein freigesetzt wird (AOAC 2000). PH-Aktivitätsprofil: Definiert als pH-Spektrum, bei der die Phytase, in Relation zu ihrem pH-Optimum, eine Restaktivität von mindestens 50 % besitzt; IT-50: Maß für die Hitzetoleranz des Proteins. Definiert als Temperatur, bei der die Phytase 50 % ihrer Aktivität im Bezug zur Inkubation bei Raumtemperatur (25 °C) aufweist. Als pH 2,5- und Pepsin-Resistenz versteht man die Restaktivität der Phytase nach 30-minütiger Inkubation, unter Verwendung eines Glycin-HCL Puffers (pH 2,5) ohne bzw. mit Pepsin-Zugabe. Als Referenz wurde die Phytaseaktivität unter Standardbedingungen nach AOAC (2000) herangezogen.

Der $InsP_6$-Abbau der Hybrid-Phytasen wurde analog zu den WT-Phytasen analysiert und die entstandenen $InsP_x$ identifiziert. Es konnten keine Abweichungen bezüglich der gebildeten $InsP_x$ gegenüber den WT-Phytasen beobachtet werden. Alle Varianten zeigten ebenfalls einen effizienteren $InsP_6$-Abbau bei einem pH-Wert von 3,0 und eine starke Akkumulation des Ins(1,2,5,6)P_4-Isomers bei pH 5,5. Das Ins(1,2,5,6)P_4 konnte von keiner der Varianten bei einem pH-Wert von 5,5 vollständig abgebaut werden. Bei einem pH-Wert von 3,0 waren nach 100 min Inkubationszeit hingegen nur noch $InsP_{1-3}$-Konzentrationen nachweisbar. Die bevorzugte Bildung des Ins(1,2,5,6)P_4 der WT-Phytasen aus *C. braakii* und *E. coli* konnte ebenfalls bei den Varianten CCE, ECC sowie ECE gezeigt werden.

Einige der Hybrid-Phytasen zeigten zum Teil bessere biochemische Eigenschaften als die Wildtyp-Phytasen. So verfügte eine Variante über eine um 2,2 °C höhere Hitzetoleranz. Bei mehreren Varianten konnte ein leicht ins saure Milieu verschobenes pH-Aktivitätsprofil beobachtet werden sowie eine Verschiebung des pH-Optimums von 4,5 auf 3,5. Außerdem zeigten alle untersuchten Hybrid-Phytasen bei einem pH-Wert von 3,0 einen effizienteren $InsP_6$-Abbau als bei einem pH-Wert von 5,5. Dies sind alles Eigenschaften, die für einen effizienten Phytatabbau *in vivo* von Bedeutung sind. Nichtsdestotrotz sind die Reaktionsbedingungen im Labor unter genau definierten Bedingungen, wie Pufferzusammensetzung, pH-Wert und Temperatur, nicht vergleichbar mit den realen Reaktionsbedingungen bei der Anwendung als Futterzusatz. Um eine erste Annäherung an die anspruchsvollen Reaktionsbedingungen *in vivo* zu simulieren, wurde eine Auswahl der Hybrid-Phytasen mit vielversprechenden Eigenschaften in einem *in vitro*-Modell nach Sommerfeld et al. (2017) untersucht.

5.5 Untersuchung des $InsP_6$-Abbaus *in vitro*

Der $InsP_6$-Abbau der Hybrid-Phytasen wurde an zwei unterschiedlichen Futtermatrices (F1 und F2) untersucht. Als Referenz wurden die WT-Phytasen mitgemessen. Die Futtermatrix F1 bestand hauptsächlich aus Mais und Kartoffelprotein und zeichnete sich durch eine minimale intrinsische Phytaseaktivität aus. Die Futtermatrix F2 hingegen, war wesentlich komplexer und verfügte über einen hohen Anteil an Mineralstoffen-, Weizen- und Rapsextraktionsschrot sowie eine vergleichsweise hohe intrinsischen Phytaseaktivität (siehe 4.2.18).

Der $InsP_6$-Abbau mit der Futtermatrix F1 lag bei einer Phytasedosierung von 100 FTU/g zwischen 34-51 % (Tabelle 30). Mit 5,7-5,9 µmol/g TM $InsP_6$ zeigte die Variante HOH sowie die WT-Phytase aus *O. proteus* die im Vergleich niedrigste $InsP_6$-Konzentration. Die gemessenen Konzentrationen der Varianten OHH, OYB, OYH und OHO sowie der WT-Phytase aus *H. alvei* waren mit 6,2-6,5 µmol/g TM signifikant höher. Die höchsten $InsP_6$-Konzentrationen konnten bei CCE sowie der WT-Phytase aus *C. braakii* gemessen werden (7,7-7,9 µmol/g TM).

Die Unterschiede in den Konzentrationen der niederen $InsP_x$ fielen zwischen den getesteten Phytasen geringer aus (siehe Tabelle 30). Ein interessantes Ergebnis ist, dass die Varianten ECC, CCE und OYH sowie die WT-Phytasen aus *E. coli* und *C. braakii* eine signifikant niedrigere Ins(1,2,3,4)P_4-Konzentration bildeten. Dafür waren die gemessenen Ins(1,2,5,6)P_4-Konzentrationen der Variante ECC und der WT-Phytase aus *E. coli* am höchsten.

Um den Abbau der niederen $InsP_x$-Isomere zwischen den eingesetzten Phytasen besser Vergleichen zu können, wurde die Enzymkonzentration um den Faktor 10 erhöht. Mit einer Enzymkonzentration von 1000 FTU/g konnte bei 6 Phytasen keine $InsP_6$-Konzentrationen mehr nachgewiesen werden. Acht der Phytasen zeigten nur geringe $InsP_6$-Konzentrationen von 0,3-0,6 µmol/g TM. Die $InsP_5$-

Konzentrationen lagen bei allen getesteten Phytasen unterhalb des Detektionslimits. Nichtsdestotrotz konnte keine der Phytasen mehr als 3-Phosphatgruppen vollständig vom Phytat-Molekül abspalten, sodass hohe $InsP_2$,- $InsP_3$- oder Ins(1,2,5,6)P_4 Konzentrationen gemessen werden konnten.

Mit Ausnahme der Varianten CCE und ECC konnten alle Hybrid-Phytasen ebenfalls beide $InsP_4$-Isomere nahezu vollständig abbauen. Die nachweisbaren Konzentrationen lagen hier bei maximal 0,5 µmol/g TM. Die Varianten CCE und ECC zeigten hingegen eine starke Akkumulation des Ins(1,2,5,6)P_4 analog zu den WT-Phytasen aus *C. braakii* und *E. coli (*6,4-9,4 µmol/g TM). Die höchste gemessene Ins(1,2,5,6)P_4-Konzentration bildete die Variante ECC. Die Variante CCE und die WT-Phytase aus *C. braakii* kamen auf eine Konzentration von 8,0-8,3 µmol/g TM, gefolgt von der WT-Phytase aus *E. coli* mit 6,4 µmol/g TM. Aufgrund der hohen Ins(1,2,5,6)P_4-Akkumulation fielen die gemessenen Konzentrationen der $InsP_3$-Isomere ($InsP_{3x}$)- und $InsP_2$ bei diesen Phytasen vergleichsweise gering aus (siehe Tabelle 30).

Den effizientesten $InsP_6$-Abbau zeigten die Varianten OHH und HOH mit $InsP_2$-Konzentrationen von 8,9-9,8 µmol/g TM bei gleichzeitig geringen $InsP_{3x}$-Konzentrationen. Die gemessenen $InsP_2$-Konzentrationen waren signifikant höher als die der WT-Phytasen aus *O. proteus* (6,8 µmol/g TM) und *H. alvei* (6,6 µmol/g TM*)*. Die geringsten $InsP_2$-Konzentrationen bildeten die WT-Phytasen aus *C. braakii* und *B. sp. GC21* sowie CCE mit 2,3-2,6 µmol/g TM, dafür allerdings hohe $InsP_{4x}$-Konzentrationen akkumulierten.

Tabelle 30: Phytat-Abbau und Bildung verschiedener Inositolphosphat-Isomere der untersuchten Phytasen in vitro unter Verwendung der Futtermatrix F1 (g/kg).

Probe	$InsP_2$	$InsP_{3x}$	$Ins(1,2,3,4)P_4$	$Ins(1,2,5,6)P_4$	$Ins(1,2,3,4,5)P_5$	$Ins(1,2,4,5,6)P_5$	$InsP_6$
100 FTU/g							
NK	-	n.d.^{d}	n.d.^{e}	<LOQ^{f}	0,4^{h}	0,8^{b}	12,0^{a}
B. sp GC21	-	0,3^{c}	1,2^{c}	1,8^{d}	2,8^{de}	0,5^{d}	7,0^{cd}
C. braakii	-	0,3	0,5^{d}	2,2^{bc}	2,6^{ef}	0,7^{c}	7,7^{b}
E. coli	-	n.d.^{d}	0,4^{d}	3,0^{a}	2,4^{fg}	0,8^{b}	7,0^{cd}
H. alvei	-	0,3	1,4^{bc}	2,0	3,3^{ac}	0,7^{c}	6,3^{ef}
O. proteus	-	0,4^{b}	2,0^{a}	2,4^{b}	3,2^{ac}	0,5^{d}	5,9^{gh}
Y. intermedia	-	0,5^{a}	1,3^{bc}	2,3^{bc}	2,8^{de}	1,0^{a}	6,1^{fh}
CCE	-	n.d.^{d}	0,4^{d}	2,2^{bc}	2,2^{g}	0,6^{cd}	7,9^{b}
ECC	-	0,3^{c}	0,5^{d}	3,2^{a}	2,7^{ef}	0,6^{cd}	6,7^{de}
HHO	-	0,3^{c}	1,3^{bc}	2,1^{c}	3,1^{c}	0,7^{c}	7,3^{c}
HOH	-	0,3^{c}	1,5^{b}	2,1^{c}	3,4^{ab}	0,6^{cd}	5,7^{h}
OHH	-	0,3^{c}	1,5^{b}	2,0^{c}	3,1^{c}	0,6^{cd}	6,2^{fg}
OHO	-	0,3^{c}	1,4^{bc}	2,0^{c}	3,1^{c}	0,7^{c}	6,5^{de}
OYB	-	0,3^{c}	1,4^{bc}	1,7^{de}	3,5^{a}	0,6^{cd}	6,4^{ef}
OYH	-	n.d.^{d}	n.d.^{e}	1,7^{de}	3,4^{ab}	0,6^{cd}	6,4^{ef}
p-Wert		*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*
1000 FTU/g							
NK	n.d.^{f}	n.d.^{h}	n.d.	<LOQ	0,4^{a}	0,8^{a}	12,3^{c}
B. sp GC21	2,2^{e}	7,0^{a}	2,1^{a}	3,0^{d}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	0,4^{b}
C. braakii	2,6^{e}	4,0^{d}	n.d.^{c}	8,3^{b}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	0,3^{b}
E. coli	3,6^{de}	3,2^{ef}	n.d.^{c}	6,4^{c}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	n.d.^{c}
H. alvei	6,6^{bc}	3,9^{d}	n.d.^{c}	n.d.^{g}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	n.d.^{c}
O. proteus	6,8^{bc}	3,7^{d}	n.d.^{c}	n.d.^{g}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	n.d.^{c}
Y. intermedia	7,5^{b}	2,2^{g}	n.d.^{c}	0,4	n.d.^{b}	n.d.^{b}	0,4^{b}
CCE	2,3^{e}	3,7^{d}	n.d.^{c}	9,4^{a}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	0,4^{b}
ECC	4,2^{d}	3,0^{f}	n.d.^{c}	8,0^{b}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	0,3^{b}
HHO	7,1^{b}	6,8^{a}	0,2^{b}	0,7^{e}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	n.d.^{c}
HOH	9,7^{a}	2,1^{g}	n.d.^{c}	n.d.^{g}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	n.d.^{c}
OHH	9,0^{a}	3,9^{d}	n.d.^{c}	n.d.^{g}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	0,4^{b}
OHO	7,4^{b}	5,5^{c}	n.d.^{c}	0,4^{ef}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	0,6^{b}
OYB	6,1^{c}	6,0^{b}	n.d.^{c}	0,4^{ef}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	n.d.^{c}
OYH	6,6^{bc}	5,1^{c}	n.d.^{c}	0,3^{f}	n.d.^{b}	n.d.^{b}	0,3^{b}
p-Wert	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*

Alle Phytasen wurden mit einer Dosierung von 100 FTU/g Futter und 1000 FTU/g Futter in dem in vitro-Modell getestet. Daten als Behandlung in LSmeans; n=3. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P<0,05) zwischen Behandlungen innerhalb einer Spalte, n.d.=nicht detektierbar in der Mehrheit der Proben, <LOQ=nicht quantifizierbar in der Mehrheit der Proben, NK=Negativkontrolle ohne exogene Phytase.

Vorversuche mit der Futtermatrix F2 zeigten, dass eine Enzymkonzentration von 100 FTU/g nicht ausreichte, um die $InsP_6$-Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) signifikant zu reduzieren. Aus diesem Grund wurde der $InsP_6$-Abbau nur mit einer Enzymkonzentration von 1000 FTU/g systematisch untersucht (siehe Tabelle 31). Des Weiteren besaß die Futtermatrix F2 eine höhere intrinsische Phytaseaktivität als F1, so zeigte die NK bereits eine deutliche Reduktion der $InsP_6$-Konzentration. Trotz intrinsischer Phytaseaktivität konnte das im Futtermittel enthaltene $InsP_6$ von keiner der untersuchten Phytasen vollständig abgebaut werden. Die nummerisch geringste $InsP_6$-Konzentration zeigte die Variante OYH zusammen mit der WT-Phytase aus *H. alvei* mit 1,1 µmol/g

TM. Die gemessenen Konzentrationen der Varianten OHH und ECC waren mit 3,5-4,4 µmol/g TM signifikant höher (Tabelle 31).

Im Vergleich zur Futtermatrix F1 fielen die Konzentrationsunterschiede der $InsP_{2-4}$-Isomere zwischen den getesteten Phytasen deutlich geringer aus. Die meisten Phytasen zeigten äquivalente Konzentrationen beider $InsP_4$-Isomere ($InsP_{4x}$). Die Präferenz der Varianten ECC und CCE bevorzugt das Ins(1,2,5,6)P_4 zu bilden, konnte aber auch in diesem Versuch gezeigt werden. So verfügten die Varianten CCE und ECC im Vergleich zu den anderen Hybrid-Phytasen über die niedrigsten Ins(1,2,3,4)P_4- und höchsten Ins(1,2,5,6)P_4-Konzentrationen. Im Gegensatz zur Futtermatrix F1 konnte die $InsP_{4x}$ von keiner der untersuchten Phytasen vollständig dephosphoryliert werden. Betrachtet man die Konzentrationen der $InsP_{4x}$ (Gesamt $InsP_4$), so bildeten die WT-Phytasen aus *Y. intermedia* und *H. alvei* signifikant weniger $InsP_{4x}$ als die WT-Phytase aus *B. sp. GC21* und allen Varianten außer OYH, welche zwischen den Werten lag.

Betrachtet man die $InsP_{3x}$-Konzentrationen, so zeigten die Varianten OHH, OYH, HOH sowie die WT-Phytasen aus *H. alvei*, *O. proteus* und *B. sp. GC21* signifikant höhere Konzentrationen als die Varianten ECC, CCE, HHO, OHO und die WT-Phytasen aus *E. coli* und *C. braakii*. Die höchsten $InsP_2$-Konzentrationen zeigten die WT-Phytasen *E. coli*, *H. alvei* und *Y. intermedia.* Die nummerisch geringsten Werte wurden bei der *C. braakii*-Phytase sowie den Varianten ECC und HHO mit 1,2-1,4 µmol/g TM gemessen.

Tabelle 31: Phytat-Abbau und Bildung verschiedener Inositolphosphat-Isomere der untersuchten Phytasen in vitro unter Verwendung der Futtermatrix F2 (g/kg).

Probe	$InsP_2$	$InsP_{3x}$	Ins(1,2,3,4) P_4	Ins(1,2,5,6) P_4	Gesamt $InsP_4$	Ins(1,2,3,4,5) P_5	Ins(1,2,4,5,6) P_5	$InsP_6$
1000 FTU/g								
NK	$0,6^{c}$	$1,4^{c}$	$2,8^{a}$	$2,3^{b}$	$5,1^{a}$	$1,5^{a}$	$1,3^{a}$	$8,0^{a}$
B. sp GC21	$2,0^{b}$	$4,2^{a}$	$3,5^{a}$	$3,0^{b}$	$6,6^{a}$	$0,5^{b}$	$0,3^{b}$	$1,9^{c}$
C. braakii	$1,4^{b}$	$2,6^{b}$	$1,4^{b}$	$3,4^{ab}$	$4,8^{ab}$	$1,0^{ab}$	$0,7^{ab}$	$2,7^{bc}$
E. coli	$2,9^{a}$	$2,8^{b}$	$0,5^{d}$	$3,8^{a}$	$4,2^{ab}$	$0,3^{b}$	$0,5^{b}$	$1,9^{c}$
H. alvei	$3,0^{a}$	$5,1^{a}$	$1,7^{b}$	$1,8^{b}$	$3,6^{b}$	$0,3^{b}$	$<LOQ^{c}$	$1,1^{c}$
O. proteus	$2,2^{b}$	$4,6^{a}$	$2,4^{ab}$	$2,5^{b}$	$4,8^{ab}$	$0,4^{b}$	$<LOQ^{c}$	$1,3^{c}$
Y. intermedia	$2,7^{a}$	$3,7^{ab}$	$1,1^{cd}$	$2,7^{b}$	$3,8^{b}$	$0,4^{b}$	$0,3^{b}$	$1,3^{c}$
CCE	$2,0^{b}$	$3,1^{b}$	$1,1^{cd}$	$4,2^{a}$	$5,3^{a}$	$0,6^{b}$	$0,6^{ab}$	$2,9^{bc}$
ECC	$1,2^{b}$	$2,5^{b}$	$1,0^{cd}$	$4,3^{a}$	$5,2^{a}$	$1,0^{ab}$	$0,7^{ab}$	$3,5^{b}$
HHO	$1,3^{b}$	$2,6^{b}$	$3,3^{a}$	$2,8^{b}$	$6,2^{a}$	$1,1^{ab}$	$0,7^{ab}$	$4,4^{b}$
HOH	$2,2^{b}$	$4,4^{a}$	$2,9^{a}$	$3,3^{ab}$	$6,2^{a}$	$0,8^{b}$	$0,3^{b}$	$2,5^{bc}$
OHH	$2,3^{b}$	$4,7^{a}$	$2,7^{a}$	$2,6^{b}$	$5,2^{a}$	$0,4^{b}$	$<LOQ^{c}$	$1,5^{c}$
OHO	$1,8^{b}$	$3,2^{b}$	$2,9^{a}$	$2,8^{b}$	$5,7^{a}$	$0,7^{b}$	$0,4^{b}$	$2,8^{bc}$
OYB	$2,0^{b}$	$3,5^{b}$	$2,8^{a}$	$2,6^{b}$	$5,4^{a}$	$0,8^{b}$	$0,3^{b}$	$2,2^{c}$
OYH	$2,3^{b}$	$4,1^{a}$	$2,3^{ab}$	$2,3^{b}$	$4,6^{ab}$	$0,5^{b}$	$<LOQ^{c}$	$1,1^{c}$
p-Wert	*<0,02*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*

Alle Phytasen wurden mit einer Dosierung von 1000 FTU/g Futter in dem in vitro-Modell getestet. Daten als Behandlung in LSmeans; n=3. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P<0,05) zwischen Behandlungen innerhalb einer Spalte, n.d.=nicht detektierbar in der Mehrheit der Proben, <LOQ=nicht quantifizierbar in der Mehrheit der Proben, NK=Negativkontrolle ohne exogene Phytase.

5.6 Einfluss polyvalenter Kationen auf die Phytaseaktivität

Um den Zusammenhang von hohen Mineralstoffgehalten und einem reduzierten Phytatabbau zu untersuchen, wurde eine Versuchsreihe mit einigen gängigen Mineralstoffverbindungen *in vitro* durchgeführt. Getestet wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen von $CaCl_2$, $FeSO_4$, $MnSO_4$ und $ZnSO_4$ auf die Pi-Freisetzung als Maß für die Phytaseaktivität und den Phytatabbau einer Phytase. Es wurden sowohl die Mineralstoffkonzentrationen als auch der pH-Wert der Phytasereaktion variiert. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der Hybrid-Phytasen und Umfang der durchgeführten Experimente, wurde der Einfluss der gewählten Mineralstoffe exemplarisch für die WT-Phytase aus *E. coli* untersucht.

Der geringste Effekt der untersuchten Mineralstoffverbindungen auf die Pi-Freisetzung der Phytase konnte mit $CaCl_2$ beobachtet werden. Bei einem pH-Wert von 3,0-4,0 wurde die Pi-Freisetzung unabhängig von der Ca-Konzentration nicht negativ beeinflusst (siehe Abbildung 9). Bei hohen Konzentrationen zwischen 1-2 mg/ml nahm die Phytaseaktivität sogar leicht zu. Bei pH-Werten über 4,0 kam es jedoch zu einer reduzierten Phytaseaktivität bei hohen Ca-Konzentrationen. Bei einem pH-Wert von 4,5 und einer Ca-Konzentration von 1 mg/ml wurde eine Restaktivität von 54 % gemessen. Die Hälfte der Konzentration reichte bereits bei einem pH-Wert von 5,0 aus, um die Phytaseaktivität um 57 % zu reduzieren. Bei einem pH-Wert von 5,5 wurde mit der gleichen Konzentration nur noch eine Restaktivität von 27 % erreicht. Niedrigere Konzentrationen ≤ 0,5 mg/ml hatten hingegen keinen Einfluss auf die Phytaseaktivität und das unabhängig vom pH-Wert (siehe Abbildung 9).

Analog zu $CaCl_2$ zeigte die Zugabe von $MnSO_4$ bis zu einem pH-Wert von 4,0 keinen negativen Effekt auf die Phytaseaktivität. Erhöhte man den pH-Wert auf 4,5, so kam es bei einer Konzentration von 1 mg/ml zu einer Abnahme der Phytaseaktivität um 80 %. Eine vergleichbare Restaktivität konnte bei einem pH-Wert von 5,0 mit 0,5 mg/ml gemessen werden. Wurde der pH-Wert auf 5,5 erhöht, so reichte bereits eine Konzentration von 0,25 mg/ml aus, um die Phytaseaktivität um 80 % zu reduzieren. Die Verbindungen $FeSO_4$ und $ZnSO_4$ konnten bereits ab einem pH-Wert von 3,0 die Pi-Freisetzung der Phytase negativ beeinflussen. Außerdem führten schon sehr geringe Konzentrationen zu einer reduzierten Phytaseaktivität. Mit einer $ZnSO_4$-Konzentration von 1 mg/ml wurde bei einem pH-Wert von 3,0 eine Restaktivität von 82 % gemessen. Bei einem pH-Wert von 3,5 führte dieselbe Konzentration zu einer Restaktivität von 20 %. Erhöhte man den pH-Wert auf 5,5 reichte bereits eine Konzentration von 0,06 mg/ml aus, um die Phytaseaktivität um 90 % zu reduzieren. Im Vergleich zu den anderen Mineralien wurde die Phosphatfreisetzung durch $ZnSO_4$ bei einem pH-Wert von 5,5 am stärksten reduziert. Im Gegensatz zu $ZnSO_4$ zeigte $FeSO_4$ bereits bei niedrigen pH-Werten einen größeren Effekt auf die Pi-Freisetzung der Phytase. So führten 0,5 mg/ml bei einem pH-Wert von 3,0 zu einer Restaktivität von nur 20 %. Der gleiche Effekt konnte mit 0,25 mg/ml und einem pH-Wert von 3,5 beobachtet werden. Die Reduktion der Phytaseaktivität nahm bei höheren pH-Werten (4,5-5,5) allerdings weniger stark zu als es bei $ZnSO_4$ der Fall war (siehe Abbildung 9).

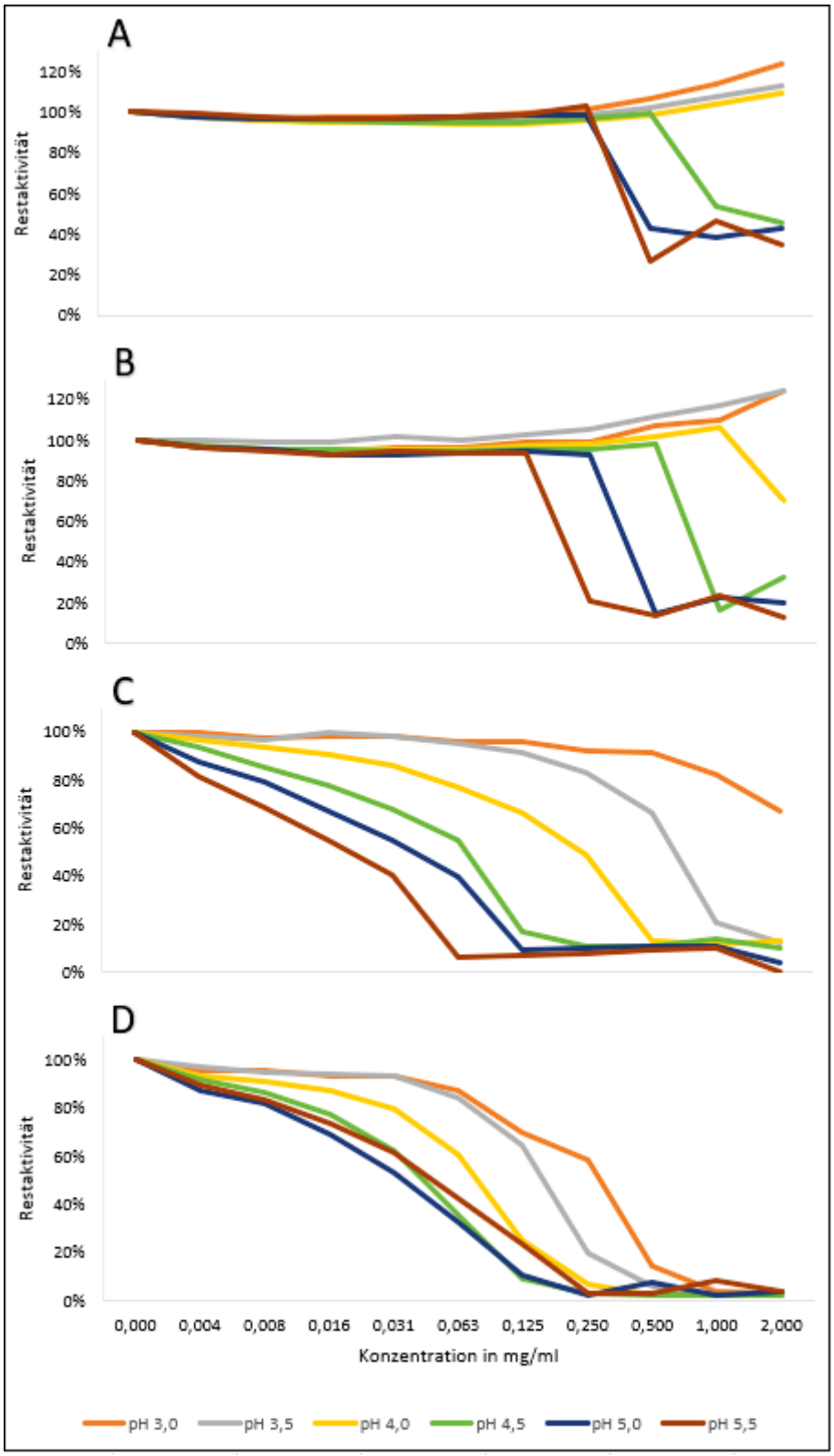

Abbildung 9: Einfluss verschiedener Mineralstoffverbindungen auf die Phytaseaktivität bei unterschiedlichen pH-Werten.

A) zeigt den Einfluss von $CaCl_2$ auf die Phosphatfreisetzung einer E. coli WT-Phytase, dargestellt als Restaktivität in %, B) gibt den Einfluss von verschiedenen $MnSO_4$-Konzentrationen wieder, C) von $ZnSO_4$ und D) von $FeSO_4$. Die unterschiedlichen Konzentrationen beziehen sich auf den Anteil der divalenten Kationen in der eingesetzten Verbindung. Farblich dargestellt sind die Restaktivitäten bei den verwendeten pH-Werten. Für die pH-Werte 3,0-4,0 wurde ein Glycin-HCl Puffer verwendet und für die pH-Werte 4,5-5,5 ein Na-Acetatpuffer.

5.7 Untersuchung des $InsP_6$-Abbaus *in vivo*

5.7.1 Inositolphosphat- und myo-Inositol-Konzentrationen im Verdauungstrakt der Broiler

Die Evaluierung der Phytaseeffizienz *in vivo* erfolgte unter anderem anhand der Quantifizierung der $InsP_x$- und MI-Konzentrationen in der *Digesta* des Kropfes, des Muskelmagens sowie des terminalen Ileums der Broiler (siehe 4.2.20). In der Tabelle 32 sind die gemessenen Konzentrationen dargestellt, welche in den verschiedenen Segmenten des GITs gemessen wurden.

Im terminalen Abschnitt des Ileums zeigte die Behandlung ohne exogene Phytase (Basal) die höchste $InsP_6$-Konzentration. Die Zugabe der OHO- sowie QB-Phytase führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der $InsP_6$-Konzentration. In den Behandlungen mit 500 FTU/kg Phytase waren die $InsP_6$-Konzentrationen mit 8,7-9,2 µmol/g TM vergleichbar. Eine signifikant niedrigere Konzentration als die Behandlungen mit 500 FTU/kg Phytase zeigte die Behandlung OHO 1500 mit 6,7 µmol/g TM gemessen. Die geringste $InsP_6$-Konzentration konnte hingegen in der Behandlung QB 1500 nachgewiesen werden.

Trotz der geringen $InsP_6$-Konzentrationen, vor allem in den Behandlungen mit hoher exogener Phytasekonzentration, konnten nur geringe Mengen niederer $InsP_x$ im Ileum nachgewiesen werden. So waren die $InsP_{4x}$-Konzentrationen in keiner der Behandlungen größer als 0,5 µmol/g TM. Außerdem konnten keine $InsP_{3x}$ nachgewiesen werden.

Im Vergleich zur Basalration hatte die Zugabe von 500 FTU/kg Phytase keinen Effekt auf die MI-Konzentrationen im terminalen Ileum. In den Behandlungen mit einer Phytase-konzentration von 1500 FTU/kg wurde die MI-Konzentrationen hingegen signifikant erhöht. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden eingesetzten Phytasen konnten hier nicht gezeigt werden.

Die $InsP_6$-Konzentration in der *Digesta* des Muskelmagens war ebenfalls in der Basalration am höchsten. Die Zugabe beider Phytasen führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der $InsP_6$-Konzentration. Die Dosierung von 500 FTU/kg OHO- und QB-Phytase zeigten eine vergleichbare $InsP_6$-Konzentration mit 4,2 bzw. 4,3 µmol/g TM. Die höhere Dosierung beider Phytasen führte zu einer weiteren signifikanten Abnahme der $InsP_6$-Konzentration auf 2,4 bzw. 3,0 µmol/g TM.

Die gemessene Ins(1,2,5,6)P_4-Konzentration war in der Behandlung QB 1500 mit 1,4 µmol/g TM am höchsten. Auch die Behandlung QB 500 zeigte eine signifikant höhere Ins(1,2,5,6)P_4-Konzentration als die Behandlung OHO 500. Auf der anderen Seite verfügten die Behandlungen mit der OHO-Phytase über signifikant höhere Ins(1,2,3,4)P_4-Konzentrationen. In den Behandlungen mit der QB-Phytase konnte dieses Isomer nicht nachgewiesen werden. Betrachtet man die Konzentration der $InsP_{4x}$ (Gesamt $InsP_4$), so ist die ermittelte Konzentration der Behandlung OHO 1500 mit 0,8 µmol/g TM signifikant niedriger als in der Behandlung QB 1500. Außerdem konnten ausschließlich in der Behandlung OHO 1500 $InsP_{3x}$-Konzentrationen nachgewiesen werden.

Die MI-Konzentration in der *Digesta* des Muskelmagens wurde durch eine Phytasedosierung von 500 FTU/kg nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten die Behandlungen mit einer höheren

Phytasedosierung von 1500 FTU/kg eine signifikante Zunahme der MI-Konzentration auf 2,0 µmol/g TM.

Ein dosisabhängiger Effekt auf die $InsP_6$-Konzentration in der Kropf-*Digesta* konnte durch die zugesetzten Phytasen nicht gezeigt werden. Im Vergleich zur Basalration und der Behandlung QB 500 zeigten die Behandlungen mit OHO-Phytase signifikant niedrigere $InsP_6$-Konzentrationen. Die niedrigste $InsP_6$-Konzentration wurde in der Behandlung OHO 1500 mit 8,5 µmol/g TM gemessen.

Die Supplementierung beider Phytasen führte zu einem signifikanten Anstieg der Ins(1,2,5,6)P_4-Konzentration im Kropf. Das Ins(1,2,3,4)P_4-Isomer konnte hingegen nur in den Behandlungen mit OHO-Phytase nachgewiesen werden. Betrachtet man die Gesamt $InsP_4$-Konzentrationen, so ist diese in den Behandlungen mit OHO-Phytase doppelt so hoch wie in der Behandlung QB 500. Mit 0,9 µmol/g TM konnte die einzige nachweisbare $InsP_{3x}$-Konzentration in der Behandlung OHO 1500 nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede der gemessenen MI-Konzentrationen konnten in der Kropf-*Digesta* nicht beobachtet werden.

Tabelle 32: Auswirkungen der zugesetzten Phytasen auf den Phytat-Abbau und die Bildung von Inositolphosphat-Isomeren in verschiedenen Segmenten des Verdauungstraktes der Broiler (µmol/g TM).

Probe	Behandlung	MI	$InsP_{3x}$	$Ins(1,2,3,4)P_4$	$Ins(1,2,5,6)P_4$	$Ins(1,2,3,4,6)P_5$	$Ins(1,2,3,4,5)P_5$	$Ins(1,2,4,5,6)P_5$	$InsP_6$
Ileum	Basal	$22,8^{c}$	n.d.	$0,3^{bc}$	$n.d.^{b}$	0,2	$0,4^{c}$	0,1	$11,0^{a}$
	OHO 500	$23,2^{c}$	n.d.	$0,4^{b}$	$0,2^{a}$	<LOQ	$0,6^{b}$	n.d.	$8,7^{b}$
	OHO 1500	$26,3^{ab}$	n.d.	$0,5^{a}$	$0,2^{a}$	n.d.	$0,9^{a}$	0,1	$6,7^{c}$
	QB 500	$24,5^{bc}$	n.d.	$0,2^{c}$	$0,3^{a}$	<LOQ	$0,7^{b}$	0,2	$9,2^{b}$
	QB 1500	$28,4^{a}$	n.d.	$0,1^{c}$	$0,3^{a}$	n.d.	$0,5^{b}$	0,1	$4,9^{d}$
	p-Wert	*<0,01*		*<0,01*	*<0,01*		*<0,01*	*0,08*	*<0,01*
Muskelmagen	Basal	$1,4^{b}$	$n.d.^{b}$	$n.d.^{b}$	$n.d.^{d}$	n.d.	$<LOQ^{c}$	$0,3^{a}$	$5,8^{a}$
	OHO 500	$1,6^{b}$	$n.d.^{b}$	$0,3^{a}$	$0,3^{c}$	n.d.	$0,7^{a}$	$0,3^{a}$	$4,2^{b}$
	OHO 1500	$2,0^{a}$	$0,7^{a}$	$0,3^{a}$	$0,5^{b}$	n.d.	$0,6^{a}$	$0,2^{b}$	$3,0^{c}$
	QB 500	$1,6^{b}$	$n.d.^{b}$	$n.d.^{b}$	$0,7^{b}$	n.d.	$0,5^{a}$	$0,3^{a}$	$4,3^{b}$
	QB 1500	$2,0^{a}$	$n.d.^{b}$	$n.d.^{b}$	$1,4^{a}$	n.d.	$0,4^{b}$	$0,2^{b}$	$2,4^{c}$
	p-Wert	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*		*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*
Kropf	Basal	1,8	$n.d.^{b}$	$n.d.^{b}$	$n.d.^{c}$	<LOQ	$0,5^{a}$	$0,9^{a}$	$10,4^{a}$
	OHO 500	1,7	$n.d.^{b}$	$0,3^{a}$	$0,9^{a}$	<LOQ	$0,4^{b}$	$0,6^{c}$	$9,3^{bc}$
	OHO 1500	1,8	$0,9^{a}$	$0,3^{a}$	$0,9^{a}$	<LOQ	$0,3^{c}$	$0,6^{c}$	$8,5^{c}$
	QB 500	1,8	$n.d.^{b}$	$n.d.^{b}$	$0,6^{b}$	<LOQ	$0,5^{a}$	$0,8^{b}$	$10,2^{a}$
	QB 1500	1,7	$n.d.^{b}$	$n.d.^{b}$	$1,0^{a}$	<LOQ	$0,4^{b}$	$0,7^{bc}$	$9,6^{ab}$
	p-Wert	*0,07*	*<0,01*	*<0,01*	*<0,01*		*<0,01*	*0,01*	*<0,01*
Futter	Basal	2,2	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	0,5	1,0	11,3
	OHO 500	2,2	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	0,5	1,0	11,5
	OHO 1500	2,8	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	0,5	1,0	11,4
	QB 500	2,2	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	0,5	1,0	11,1
	QB 1500	2,2	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	0,5	1,0	11,1

Daten als Behandlung in LSmeans;Tag 11-21, n=8 Abteile je Behandlung, Basal= Ration ohne Enzymzulage, 500= 500 FTU/kg, 1500= 1500 FTU/kg, OHO= OHO-Phytase, QB= Quantum Blue 5G, Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Konzentrationsunterschiede (P<0,05) zwischen den Behandlungen innerhalb eines Beprobungsabschnitt, n.d.=nicht detektierbar in der Mehrheit der Proben, <LOQ=nicht quantifizierbar in der Mehrheit der Proben.

5.7.2 Praecaecaler $InsP_6$-Abbau sowie Calcium- und Phosphor-Verdaulichkeit

Der pc $InsP_6$-Abbau war in der Basalration und QB 500 mit 63,5-64,8 % am. Die Zugabe der OHO-Phytase führte im Vergleich zur Basalration zu einer signifikanten Zunahme des pc $InsP_6$-Abbaus auf 71,9-76,3 %. Eine weitere Zunahme konnte in der Behandlung QB 1500 beobachtet werden. Hier lag der pc $InsP_6$-Abbau bei 83,3 %, was im Vergleich zur Basalration einer Zunahme von 19,8 % entspricht. Ein vergleichbarer Effekt der zugesetzten Phytasen konnte bei der pc P-Verdaulichkeit der Broiler beobachtet werden. In den Behandlungen Basal und QB 500 war die pc P-Verdaulichkeit mit 60,7-62,7 % am geringsten. Die Zugabe der OHO-Phytase führte in beiden Dosierungen zu einer signifikanten Zunahme der pc P-Verdaulichkeit auf 67,7-69,5 %. Ein weiterer signifikanter Anstieg konnte in der Behandlung QB 1500 mit 74,7 % gemessen werden. Die pc Ca-Verdaulichkeit wurde durch die Zugabe der exogenen Phytase weniger stark beeinflusst als die pc P-Verdaulichkeit oder der $InsP_6$-Abbau. Mit Ausnahme der Behandlung OHO 500 konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Die Zugabe von 500 FTU/kg OHO-Phytase führte im Vergleich zur Basalration zu einer Zunahme der pc Ca-Verdaulichkeit um 2,7 %. Die ermittelten Daten des pc $InsP_6$-Abbaus sowie der pc P- und Ca-Verdaulichkeit sind in der Abbildung 10 sowie Tabelle 33 dargestellt.

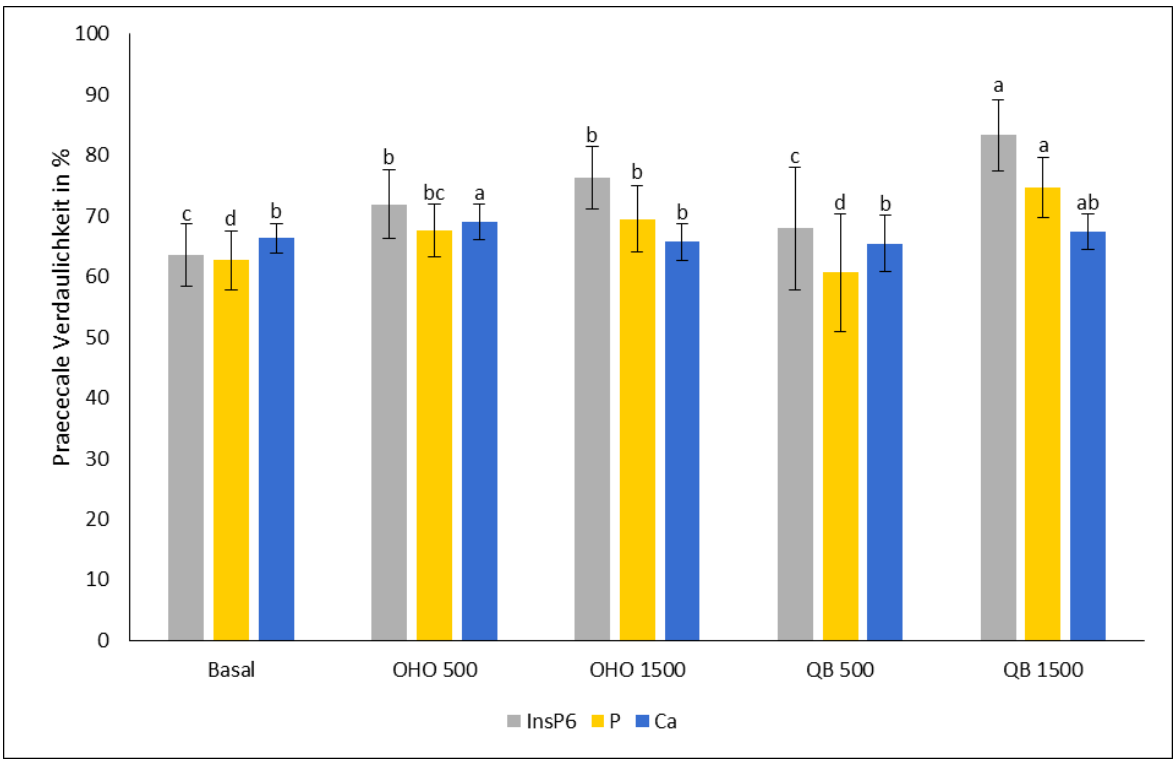

Abbildung 10: Auswirkungen der supplementierten Phytasen auf die relative praecaecale Calcium- und Phosphor-Verdaulichkeit sowie den praecaecalen $InsP_6$-Abbau in der Digesta der Broiler.

Dargestellt ist die relative praecaecale Verdaulichkeit bzw. der Abbau von Phytat ($InsP_6$), Phosphor (P) und Calcium (Ca), inklusive Standardabweichung in %. Die Kalkulation der Daten erfolgte entsprechend der gepoolten Konzentrationen in den Futter- und Digesta-Proben, unter Berücksichtigung des unverdaulichen Markers Titandioxid (TiO_2). Tag 11-21, n=8 Abteile pro Behandlung, Basal= Ration ohne Enzymzulage, 500= 500 FTU/kg, 1500= 1500 FTU/kg, OHO= OHO-Phytase, QB= Quantum Blue 5G, Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P<0,05) zwischen den Behandlungen.

Tabelle 33: Auswirkungen der supplementierten Phytasen auf die relative praecaecale Calcium- und Phosphor-Verdaulichkeit sowie den praecaecalen $InsP_6$-Abbau in der Digesta der Broiler.

Praecaecale Verdaulichkeit		Basal	OHO 500	OHO 1500	QB 500	QB 1500
$InsP_6$		$63,5^{c}$	$71,9^{b}$	$76,3^{b}$	$64,8^{c}$	$83,3^{a}$
	SD	5,2	5,6	5,2	10,1	5,9
P		$62,7^{d}$	$67,7^{bc}$	$69,5^{b}$	$60,7^{d}$	$74,7^{a}$
	SD	4,9	4,4	5,5	9,8	5,0
Ca		$66,3^{b}$	$69,0^{a}$	$65,8^{b}$	$65,5^{b}$	$67,4^{ab}$
	SD	2,5	2,9	3,0	4,6	2,9

Relative praecaecale Verdaulichkeit bzw. Abbau von Phytat ($InsP_6$), Phosphor (P) und Calcium (Ca), inklusive Standardabweichung in %. Die Kalkulation der Daten erfolgte entsprechend der gepoolten Konzentrationen in den Futter- und Digesta-Proben, unter Berücksichtigung des unverdaulichen Markers Titandioxid (TiO_2). Tag 11-21, n=8 Abteile pro Behandlung, Basal= Ration ohne Enzymzulage, 500= 500 FTU/kg, 1500= 1500 FTU/kg, OHO= OHO-Phytase, QB= Quantum Blue 5G, Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P<0,05) zwischen den Behandlungen.

5.7.3 Wachstumsdaten der Broiler im Tierversuch

Zu Beginn der experimentellen Fütterungsperiode war das initiale Körpergewicht der Broiler homogen über alle Behandlungsgruppen hinweg verteilt. Die Gewichte pro Abteil betrugen im Mittel 3500 ± 78 g. Die Broiler zeigten keine gesundheitlichen Auffälligkeiten während der gesamten Versuchsdauer. Die Mortalität war sehr gering und stand in keinem Zusammenhang mit einer der Behandlungen. Insgesamt starben 3 von 616 Tieren während der experimentellen Fütterungsperiode, wobei jedes der Tiere aus einer anderen Behandlungs-gruppe stammte.

Die untersuchten Leistungsdaten der Broiler sind in der Tabelle 34 dargestellt und umfassten ADG, ADFI, G:F und den Fußaschegehalt. Die Enzymzugabe führte unabhängig von der eingesetzten Phytase zu einer dosisabhängigen Zunahme der ADG, G:F und dem Fußaschegehalt. Die ADG war in der Basalration mit 51,3 g/d am geringsten. Die Behandlungen mit einer Phytasedosierung von 500 FTU/kg erhöhten die ADG im Vergleich zur Basalration um 9,4-11,3 %. Die höhere Dosierung von 1500 FTU/kg führte zu einer weiteren signifikanten Zunahme der ADG um bis zu 9,1 %. So zeigten die Behandlungen OHO 1500 und QB 1500 eine ADG von 60,2-60,8 g/d. Dies entspricht im Vergleich zur Basalration einer Zunahme von 17,3-18,5 %.

Die ADFI war in dem Fütterungsversuch mit 76,8 g/d ebenfalls in der Behandlung mit der Basalration am geringsten. Die Enzymzugabe führte in allen Behandlungen zu einer signifikanten Zunahme der ADFI. Die höchste Futteraufnahme konnte in der Behandlung OHO 1500 mit 84,3 g/d beobachtet werden.

Die Zugabe der OHO- sowie QB-Phytase führte zu einer dosisabhängigen Zunahme der Futtereffizienz. Analog zur ADG wurde das G:F mit einer Phytasedosierung von 500 FTU/kg signifikant auf 0,70 erhöht. Die Phytasedosierung von 1500 FTU/kg führte zu einer weiteren signifikanten Zunahme der G:F auf einen Wert von 0,72-0,73. Einen statistisch signifikanten

Unterschied zwischen der OHO- und QB-Phytase konnte weder bei der ADG noch bei der G:F gezeigt werden.

Der Fußaschegehalt betrug am Ende der experimentellen Fütterungsperiode 0,74 g in der Basalration und zeigte somit den niedrigsten Wert der Behandlungen. Die Zugabe beider Phytasen in einer Konzentration von 500 FTU/kg führte zu einer signifikanten Zunahme des Fußaschegehaltes auf 0,83-0,85 g. Die höhere Phytasedosierung führte zu einer weiteren signifikanten Zunahme des Fußaschegehaltes auf 0,90-0,93 g. Im Vergleich zur Basalration entspricht dies einer Zunahme von 21,6-25,7 %.

Ebenso wie der ADG und G:F zeigten beide Phytasen einen vergleichbaren Effekt auf den Fußaschegehalt der Broiler. Insgesamt führte die Zugabe der OHO- und QB-Phytase zu einem verbesserten Wachstum, einer höheren Futtereffizienz sowie Knochenmineralisierung der Broiler.

Tabelle 34: Effekte der zugesetzten Phytasen auf die Leistungsdaten und den Fußaschegehalt der Broiler.

	Basal	OHO 500	OHO 1500	QB 500	QB 1500
ADG (g)	51,3[c]	56,1[b]	60,8[a]	57,1[b]	60,2[a]
ADFI (g)	76,8[c]	81,0[b]	84,3[a]	81,3[b]	83,2[ab]
G:F	0,67[c]	0,70[b]	0,72[a]	0,70[b]	0,73[a]
Fußaschegehalt (g)	0,74[c]	0,83[b]	0,93[a]	0,85[b]	0,90[a]

Daten als Behandlung in LSmeans; Tag 11-21, n=8 Wiederholungen, 11 Tiere pro Abteil, Fußasche: 4x rechter Fuß je Abteil, Basalration ohne Enzymzulage, 500=500 FTU/kg, 1500= 1500 FTU/kg, OHO=OHO-Phytase, QB=QB-Phytase, QB=Quantum Blue 5G, Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P<0,05) zwischen den Behandlungen innerhalb einer Zeile.

6 Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, aus einer Auswahl an bekannten WT-Phytasen eine Vielzahl sequenziell neuartiger Hybrid-Phytasen zu erzeugen und diese sukzessive auf ihre Effizienz als Futterzusatz hin zu untersuchen. Der Evaluierungsprozess reichte von der Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften über die Identifizierung der spezifischen Abbauprodukte, die bei der $InsP_6$-Hydrolyse entstehen, bis hin zur Analyse des $InsP_6$-Abbaus an komplexen Futtermatrices unter Reaktionsbedingungen, welche den GIT von Broilern simulierten. Alle erhobenen Daten dienten als wissenschaftliche Grundlage zur Auswahl einer der getesteten Hybrid-Phytasen für den Einsatz in einem Fütterungsversuch mit Broilern, um letzten Endes die Phytaseeffizienz *in vivo* bewerten zu können.

6.1 Die Rekombinationsbibliothek

Über die Kombination von Gensequenzen verschiedener bereits bekannter Phytasegene mit guten biochemischen Eigenschaften wurden Hybrid-Phytasen erzeugt, die so in der Natur nicht vorkommen. Mit insgesamt 24 *Biobricks* aus 8 unterschiedlichen WT-Phytasen konnten 504 Hybrid-Phytasen gebildet werden, die nach Varianten mit einer hohen Phytaseaktivität systematisch analysiert wurden.

Die erfolgreiche Rekombination der über PCR amplifizierten *Biobricks* konnte mittels Sequenzierung bestätigt werden. Die Sequenzen von 15 zufällig ausgewählten Kolonien zeigten keinen bevorzugten Einbau einer der *Biobricks* oder das Fehlen von Sequenzen aus einem der 8 Organismen. Bei der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse konnten außerdem keine ungewollten Mutationen oder Leserasterverschiebungen nachgewiesen werden, was für die geringe Fehlerrate der verwendeten Q5-DNA-Polymerase spricht. Eine geringe Fehlerrate sowie hohe Effizienz der *Golden Gate*-Methode konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden (Engler et al. 2009; Yan et al. 2010; Engler und Marillonnet 2013). In der Publikation von Engler et al. (2009) wurde die effiziente Rekombination von insgesamt neun separaten DNA-Fragmenten von je drei unterschiedlichen *Trypsinogen*-Genen und somit 19683 möglichen Kombinationen gezeigt. Mit 97 % korrekt legierter Konstrukte war die Fehlerrate sehr gering. Demzufolge eignet sich die *Golden Gate*-Methode auch exzellent für die Rekombination einer größeren Anzahl an *Biobricks*. Laut Literatur nimmt jedoch die Transformationseffizienz mit steigender Anzahl und abnehmender Größe der verwendeten *Biobricks* ab (Engler und Marillonnet 2013). Zu kleine Fragmente müssen daher subkloniert werden, um die Transformationseffizienz zu erhöhen.

Voraussetzung für das Gelingen der Rekombination ist das Design der Primer, die zur Herstellung der *Biobricks* benötigt werden (siehe Abbildung 11). Die Rekombinationsstellen wurden so konstruiert, dass sich die *Biobricks* nur in einer bestimmten Reihenfolge miteinander kombinieren lassen. Dadurch

wurde der strukturelle Aufbau der Hybrid-Phytasen gleich gehalten, was die Anzahl aktiver Hybrid-Phytasen erhöhen sollte.

Bei der Rekombinationsstelle handelt es sich um eine Erkennungssequenz für das TypII-S-Restriktionsenzym *BsaI*, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet. Dadurch kann die DNA an der Position nur einmal geschnitten werden und die Zielsequenz wird akkumuliert. Beim Schneiden der DNA entstehen Überhänge (*sticky ends*) in einer Länge von 4 Basenpaaren. Aus diesem Grund benötigte man für die Wahl einer Rekombinationsstelle zwischen verschiedenen Genen nur eine Homologie von einer Aminosäure (kodiert durch 3 Basen) und die vor diesem Codon liegende „*wobble*-Base“. Die Rekombinationsstellen können dadurch in den Zielgenen nahezu frei gewählt werden, ohne, dass die Aminosäuresequenz verändert wird. Andere Methoden benötigen meist einen größeren homologen Bereich zwischen den zu kombinierenden Genen, was die Wahl der Rekombinationsstelle einschränken kann. So benötigt man bei einer vergleichbaren Methode wie der *Overlap Extension PCR* zum Beispiel 15 homologe Nukleotide um zwei DNA-Fragmente miteinander zu verbinden (Urban et al. 1997; Bryksin und Matsumura 2010). Eine weitere Alternative stellt die *PTRec*-Methode dar. Hier benötigt man für die Rekombination einen homologen Bereich von 12 Basenpaaren. Bei dieser Methode wird auf die Verwendung von Restriktionsenzymen verzichtet und die Bildung der *Biobricks* erfolgt durch die chemische Spaltung von zuvor eingefügten Phosphothioat-Oligonukleotiden (Marienhagen et al. 2012; Herrmann et al. 2021).

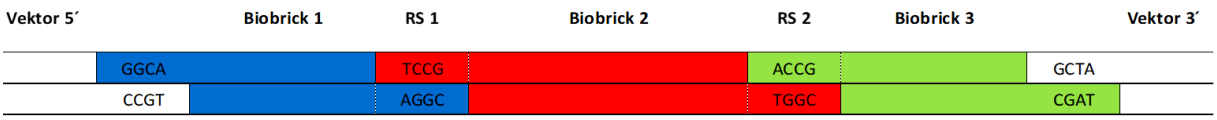

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Aufbaus der via PCR synthetisierten Biobricks

Die dargestellten Biobricks bilden zusammen ein intaktes Phytasegen. Die Basenpaare (GGCA, TCCG etc.) stellen die 3´- und 5´- Überhänge der Biobricks dar (sticky ends) und bilden gleichzeitig die Rekombinationsstellen (RS 1 + RS 2) an denen die Biobricks aus den 8 unterschiedlichen Organismen miteinander verbunden werden. Die genannten Basenpaare sind die Überhänge, die beim Schneiden der Phytasegene durch das Restriktionsenzym BsaI entstehen. In Grau sind die beiden Enden des Vektors dargestellt, mit dessen Hilfe die Hybrid-Phytasen in den Expressionswirt eingebracht werden.

Während der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek bei einem pH-Wert von 3,0 und 5,5 konnten insgesamt 24 unterschiedliche Hybrid-Phytasen mit Volumenaktivitäten auf Wildtyp-Niveau identifiziert werden. Anhand der Häufigkeit der identifizierten *Biobricks* führte die Kombination der Phytasegene aus den Organismen *O. proteus*, *B. sp. GC21* und *H. alvei* zu einer hohen Funktionalität. Auch die *Biobricks* aus *E. coli* und *C. braakii* wurden bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich untereinander rekombiniert. Selten sind hingegen Hybrid-Phytasen mit Beteiligung der *Biobricks* aus *E. sp. biph 1* oder *Y. intermedia*. Vergleicht man die *Biobricks* aus denen sich die Hybrid-Phytasen

zusammensetzen, so fällt auf, dass viele Hybrid-Phytasen aus *Biobricks* bestehen, die aus Organismen stammen, deren Phytasegene eine hohe sequenzielle Homologie aufweisen.

Anders als bei der Sequenzierung der 15 zufällig ausgewählten Kolonien, konnte bei der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek keine Hybrid-Phytase identifiziert werden, die aus einem *Biobrick* der *D. paradisiaca*-Phytase bestand. Dies lässt auf eine geringe Aktivität der entstandenen Varianten schließen. Die Phytase aus *D. paradisiaca* ist im Gegensatz zu den anderen involvierten Phytasen eine 3-Phytase und besitzt eine andere Stereospezifität in ihrer $InsP_6$-Hydrolyse.

Vergleicht man die AS-Sequenzen der involvierten WT-Phytasen miteinander, so sind die Unterschiede zum Phytasegen aus *D. paradisiaca* am größten. Die *Alignments* der Phytasegene aus *H. alvei*, *B. sp. GC21* und *O. proteus* zeigten zum Beispiel eine hohe Übereinstimmung von 71-73 %. Die Phytasen aus *E. coli* und *C. braakii* kommen auf 62 %. Im Gegensatz dazu besitzt die Phytase aus *D. paradisiaca* zu den 6-Phytasen eine Sequenzhomologie von nur 27-30 %. Aus diesem Grund sind die *Biobricks* der 3-Phytase vermutlich weniger kompatibel zu den *Biobricks* der 6-Phytasen. Die großen sequenziellen Unterschiede könnten bei einer Rekombination vermutlich zu einer veränderten Proteinstruktur bzw. Enzymfaltung geführt haben, welche die Substrataffinität und $InsP_6$-Hydrolyse negativ beeinflussten.

Die Voraussetzung einer hohen sequenziellen Übereinstimmung, um funktionsfähige Enzyme zu bilden, stellt einen Nachteil von Methoden dar, die auf dem Austausch von Gensequenzen beruhen. Zwar können über die kurze Rekombinationsstelle der *Golden Gate*-Methode Gensequenzen aus den unterschiedlichsten Proteinen an beliebigen Punkten miteinander kombiniert werden, allerdings ist die Aussicht, ein funktionsfähiges Enzym zu bilden geringer, je kleiner die strukturellen Gemeinsamkeiten sind. Hohe sequenzielle Übereinstimmungen und ein identischer Aufbau der Proteindomänen sind daher wichtige Aspekte, die bei der Auswahl der zu kombinierenden Gene eine Rolle spielen. So wäre die Rekombination von verschiedenen Phytaseklassen wenig sinnvoll, da sich die Phytasen grundlegend in ihrem Katalysemechanismus unterscheiden und wenig strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen.

Natürlich spielt in diesem Zusammenhang auch die Größe und Anzahl der *Biobricks* eine Rolle. Bei der hier durchgeführten Aufteilung der Phytasegene in 3 Abschnitte ist eine hohe sequenzielle Homologie nötig, damit Struktur und Faltung des Moleküls intakt bleiben. Je kleiner die *Biobricks* sind, desto höher ist die Komplexität der Rekombinationsbibliothek. Gleichzeitig nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass funktionsfähige Enzyme entstehen, die eine höhere sequenzielle Variabilität aufweisen. Abhängig von der Komplexität wächst der Aufwand für die Analyse der möglichen Rekombinanten erheblich.

Die sequenziellen Unterschiede der in dieser Arbeit identifizierten Hybrid-Phytasen sind am größten, wenn sie aus den *Biobricks* dreier unterschiedlicher Phytasegene aufgebaut sind. So verfügten die Varianten OHB, OYH, OEnH, OBH, OYB, CYO und OCB trotz der Unterschiede über eine hohe

Volumenaktivität. Interessant ist jedoch, dass die sequenziellen Unterschiede der beiden äußeren *Biobricks* wiederum sehr gering sind. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn die beiden äußeren *Biobricks* aus *O. proteus* und *H. alvei*, oder *O. proteus* und *B. sp. GC21* bestehen.

Noch deutlicher wird der Zusammenhang, wenn man die spezifischen Aktivitäten der Hybrid-Phytasen betrachtet, bei denen die äußeren *Biobricks* aus ein und demselben Organismus stammen (hierzu später mehr). Eine mögliche Erklärung für die hohe Funktionalität der Varianten mit Sequenzen aus 3 WT-Phytasen bietet die Lokalisierung der hochkonservierten Motive des aktiven Zentrums. Alle HAP besitzen ein C-terminales RHGxRxP Motiv und ein N-terminales HD-Motiv, welche sich bei korrekter Faltung zu einem katalytisch aktiven Zentrum zusammensetzen (van Etten et al. 1991; Ostanin et al. 1992; Ullah und Phillippy 1994; Ariza et al. 2013). Das RHGxRxP-Motiv befindet sich am Beginn des ersten *Biobricks*, das HD-Motiv liegt hingegen in der Mitte des *Biobricks* Nr.3 (siehe Abbildung Nr. 12). Verfügen die beiden äußeren *Biobricks* über eine hohe sequenzielle Übereinstimmung, so besitzen die Hybrid-Phytasen ein aktives Zentrum, welches dem der WT-Phytase ähnelt. Die Kompatibilität der beiden äußeren *Biobricks* 1 und 3 könnte aus diesem Grund einen großen Einfluss auf die Funktionalität der hier erzeugten Hybrid-Phytasen besitzen.

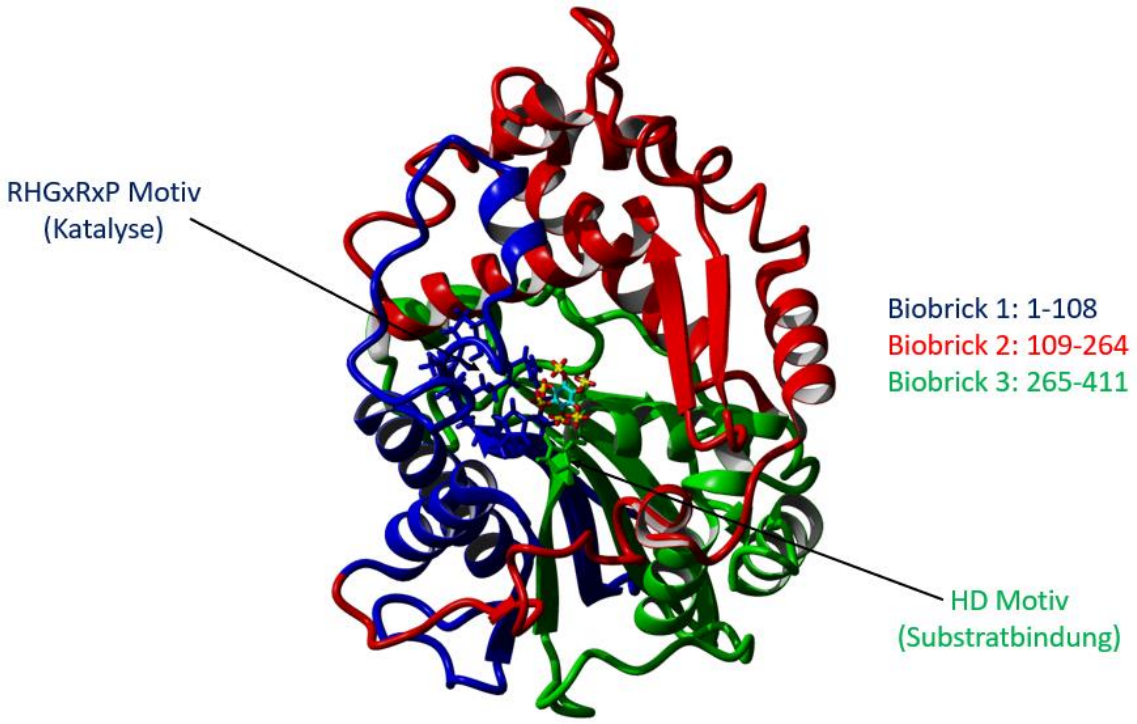

Abbildung 12: Strukturelle Darstellung einer Hybrid-Phytase angelehnt an die Sequenz der Wildtyp-Phytase aus Hafnia alvei dargestellt als Bändermodell (Cartoon).

Die drei Biobricks der Rekombinationsbibliothek sind in den Farben Blau, Rot und Grün markiert. Die AS-Reste der beiden hoch konservierten Motive RHGxRxP und HD im aktiven Zentrum sind als „sticks“ dargestellt. Ebenfalls im aktiven Zentrum zu sehen ist der Phytase-Inhibitor myo-Inositol Hexasulfat (Cyan). Die Struktur wurde mit Hilfe der YASARA-Software erstellt, die PDB-Datei wurde von der Proteindatenbank (RCSB PDB) bezogen: PDB-Code: 4ARO, Chain: A.

Bei der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek konnten je nach pH-Wert zwischen 51,4-71,2 % der exprimierten Phytasen als aktiv eingestuft werden. Im Vergleich zu anderen Rekombinationsstudien mit Enzymen ist der Anteil an aktiven Phytasen als hoch einzuschätzen. Es ist durchaus möglich, dass > 90 % der gebildeten Hybrid-Enzyme inaktiv sein können (Herrmann et al. 2021). Ein mögliche Erklärung für den hohen Anteil aktiver Phytasen ist, dass die Rekombination der *Biobricks* nur in einer bestimmten Reihenfolge stattfinden konnte, womit der strukturelle Aufbau der Phytasen konserviert wurde. Dass bei einem pH-Wert von 3,0 deutlich mehr aktive Phytasen nachgewiesen werden konnten als bei einem pH-Wert von 5,5, lässt sich unter anderem mit dem pH-Aktivitätsprofil der involvierten WT-Phytasen erklären. So zeigten die meisten WT-Phytasen, bezogen auf ihr pH-Optimum, eine höhere Restaktivität bei einem pH-Wert von 3,0 als bei einem pH-Wert von 5,5. Darüber hinaus könnte das Ergebnis auch im Zusammenhang mit einer verbesserten Substratlöslichkeit stehen. Anders als bei der Bestimmung der biochemischen Eigenschaften, lagen die Phytasen bei der Durchmusterung der Rekombinationsbibliothek nicht gereinigt vor. Die Phytaseaktivität wurde aus dem Überstand der Expressionskulturen ermittelt. Aus diesem Grund waren Medienbestandteile, Zelltrümmer, Stoffwechselprodukte etc. während der Analyse der Aktivität vorhanden, welche den $InsP_6$-Abbau und die Messung der freigesetzten Pi-Konzentration beeinflusst haben könnte. Bei einem pH-Wert von 5,5 wäre es daher möglich, dass der $InsP_6$-Abbau durch die Ausbildung von $InsP_6$-Komplexen negativ beeinflusst wurde.

Bei einem niedrigen pH-Wert, wie 3,0, ist das Na-Phytat aufgrund seiner Ladung besser löslich und kann effizienter dephosphoryliert werden. $InsP_6$-Komplexe bilden sich hingegen vermehrt bei höheren pH-Werten aus, da die negative Ladung des $InsP_6$-Moleküls mit steigendem pH zunimmt (Selle et al. 2009; Adeola und Cowieson 2011). Des Weiteren bietet die Analyse der Proben bei einem pH-Wert von 3,0 den Vorteil, dass vermehrt Hybrid-Phytasen gefunden werden können, welche über eine gute Aktivität unter sauren pH-Bedingungen verfügen, wie sie im Magen von Nutztieren vorkommen und der als Hautwirkungsort exogener Phytasen gilt (Dersjant-Li et al. 2015).

6.2 Diskussion der biochemischen Eigenschaften

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die biochemischen Eigenschaften einer Phytase durch den Austausch von Genfragmenten aus anderen WT-Phytasen verbessern lassen. Relevante Eigenschaften der erzeugten Hybrid-Phytasen, die hinsichtlich der Anforderungen an ein Futtermitteladditiv im Folgenden näher diskutiert werden, sind die spezifische Aktivität, das pH-Aktivitätsprofil sowie die Toleranz gegenüber proteolytischem Abbau und hohen Temperaturen.

6.2.1 Spezifische Aktivität

Nach einer offiziell anerkannten Methode ist die spezifische Aktivität definiert als Menge Pi (µmol), die pro min und mg Enzym von 5,1 mM Na-Phytat bei einem 50 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5) freigesetzt wird (AOAC 2000). Die Bestimmung der spezifischen Aktivität unter standardisierten Bedingungen bei einem pH-Wert von 5,5 sorgt für eine gewisse Vergleichbarkeit der Phytasen, da sie anhand ihrer Aktivität dem Futtermittel beigemischt werden und nicht anhand ihrer molekularen Masse. Der pH-Wert 5,5 gleicht jedoch nicht dem Hauptwirkungsort der Phytasen *in vivo*, sondern ist historisch gewachsen und entspricht dem pH-Optimum der ersten kommerziellen Phytase (Natuphos, BASF). Die ermittelte Phytaseaktivität unter Standardbedingungen bei einem pH-Wert von 5,5 sagt daher wenig über die Effizienz der eingesetzten Phytasen *in vivo* aus.

In dieser Arbeit wurde die spezifische Aktivität aller involvierten Phytasen bei zwei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Dadurch konnte der $InsP_6$-Abbau bei den pH-Werten 3,0 und 5,5 mit einer vergleichbaren Phytaseaktivität untersucht werden. Die pH-abhängigen Aktivitätsunterschiede konnten über die Dosierung der Enzymkonzentration ausgeglichen werden. Dabei ist der pH-Wert von 3,0 eine Näherung an den pH-Bereich, der als Hauptwirkungsort exogener Phytasen in Geflügel und Schweinen gilt (Dersjant-Li et al. 2015).

Eine hohe spezifische Aktivität ermöglicht eine schnelle Dephosphorylierung des $InsP_6$. Es sollte beachtet werden, dass bei der Aktivitätsbestimmung unter Standardbedingungen das Substrat im Überschuss vorliegt und durch die geringe Inkubationszeit in der Regel nur die Phosphatfreisetzung durch die Hydrolyse von $InsP_6$-$InsP_4$ berücksichtig wird. Es ist jedoch nicht ersichtlich wie vollständig das $InsP_6$ abgebaut werden kann und ob es zu einer Akkumulation von Zwischenprodukten kommt. Hierzu ist es notwendig, die Konzentrationen der Abbauprodukte zu quantifizieren, die beim $InsP_6$-Abbau entstehen. Eine hohe spezifische Aktivität für $InsP_6$ deutet auf ein enges Substratspektrum hin, da das aktive Zentrum der Phytase optimal an das Substrat angepasst ist. Niedere Inositolphosphate, wie $InsP_{1-4}$ stellen aus diesem Grund meist schlechtere Substrate dar und können weniger effizient dephosphoryliert werden (Wyss et al. 1999; Menezes-Blackburn et al. 2022).

Das natürliche, im Futtermittel enthaltene $InsP_6$ ist limitiert und unterscheidet sich von dem chemisch synthetisierten Na-Phytat, welches bei der Aktivitätsbestimmung eingesetzt wird. Eine hohe spezifische Aktivität an Na-Phytat impliziert daher nicht, dass das $InsP_6$ *in vivo* genauso effizient abgebaut werden kann. Aus diesem Grund ist neben der spezifischen Aktivität ebenfalls die Substratspezifität ein wichtiges Kriterium für einen effizienten $InsP_6$-Abbau.

Die ermittelten spezifischen Aktivitäten der Hybrid-Phytasen orientierten sich an den Aktivitäten der WT-Phytasen, aus denen sie bestehen. Die Varianten ECC, ECE und CCE zeigten beispielweise mit 832-936 U/mg bei einem pH-Wert von 5,5 und 37 °C eine vergleichbare Aktivität wie die WT-Phytasen aus *E. coli* (889 U/mg) und *C. braakii* (925 U/mg). Die Variante ECE besitzt eine etwas höhere Homologie zur *E. coli*-Phytase, was die geringere spezifische Aktivität im Vergleich zu den

Varianten CCE und ECC erklären könnte. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Lokalisierung der hoch konservierten Motive, welche zusammen das aktive Zentrum bilden. Bei der Variante ECE stammen beide konservierten Motive und ihre direkte Umgebung aus der WT-Phytase von *E. coli*. Aus diesem Grund verfügt die Variante ECE über ein aktives Zentrum, welches der *E. coli*-Phytase sehr ähnlich ist. Es liegt nahe, dass die spezifische Aktivität daher dieser WT-Phytase gleicht.

Auch bei den Varianten BHB und HBH lässt sich ein solcher Zusammenhang erkennen. Wie die WT-Phytase aus *H. alvei* (731 U/mg) verfügt die Variante HBH mit 782 U/mg über eine höhere spezifische Aktivität als die Variante BHB mit 567 U/mg, welche mehr der WT-Phytase aus *B. sp. GC21* (476 U/mg) ähnelt. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei den Varianten OYB und OYH gemacht werden. Hier orientierte sich die spezifische Aktivität mit 447 U/mg und 526 U/mg an der WT-Phytase aus *O. proteus* (446 U/mg). In diesem Fall setzten sich die aktiven Zentren von OYH und OYB aus dem RHGxRxP-Motiv der *O. proteus*-Phytase und dem HD-Motiv aus *H. alvei* bzw. *B. sp. GC21* zusammen, welche über eine hohe sequenzielle Homologie verfügen. Vermutlich wird die Phytaseaktivität, der hier untersuchten Hybrid-Phytasen primär über die Aminosäuresequenzen der beiden äußeren *Biobricks* definiert.

Modifikationen der mittleren Sequenz könnten dennoch Auswirkungen auf die Proteinfaltung und somit auf die Bindung des Substrates sowie die katalytische Aktivität des Enzyms haben. Die Veränderungen der mittleren Sequenz, der hier untersuchten Varianten, hatten vermutlich nur einen geringen Einfluss auf die Phytaseaktivität, weil der strukturelle Aufbau der Proteindomänen und die Enzymfaltung zwischen den involvierten 6-Phytasen grundsätzlich stark konserviert ist.

Die in der Literatur publizierten spezifischen Aktivitäten weichen zum Teil von den hier ermittelten Aktivitäten ab. Ein Grund dafür ist, dass die Phytasen nicht unter den erwähnten Standardbedingungen gemessen wurden, sondern oft unter den optimalen Bedingungen der jeweiligen Phytase. Für einen Vergleich der Aktivitäten ist es daher wichtig die exakten Reaktionsbedingungen zu beachten. Nach Kim et al. (2003) zeigte die Phytase aus *C. braakii* eine hohe spezifische Aktivität mit 3457 U/mg. Allerdings wurde die Aktivität bei dem pH-Optimum der Phytase gemessen (pH 4,0). Aus diesem Grund weichen die hier gemessenen spezifischen Aktivitäten mit 1414 U/mg (pH 3,0) und 925 U/mg (pH 5,5) deutlich ab. Das gleiche ist der Fall bei der WT-Phytase aus *Y. intermedia*. Bei einem pH-Wert von 4,5 und 4 mM Na-Phytat verfügt die Phytase laut Literatur über eine spezifische Aktivität von 3112,8 U/mg (Vieira et al. 2019). Neben dem pH-Wert können auch unterschiedliche Puffer und ihre Konzentrationen, das Substrat, die Inkubationszeit und Temperatur die Ergebnisse beeinflussen. Die spezifische Aktivität der WT-Phytasen aus *O. proteus* und *E. coli* beträgt laut Literatur 310 U/mg und 750-811 U/mg und unterscheiden sich von den hier gemessenen Aktivitäten weniger stark (Wyss et al. 1999; Zinin et al. 2004; Greiner und Konietzny 2010).

Neben der spezifischen Aktivität und Substratspezifität wird der $InsP_6$-Abbau im GIT der Nichtwiederkäuer maßgeblich durch das pH-Aktivitätsprofil der Phytasen beeinflusst.

6.2.2 pH-Aktivitätsprofil

Die Aktivität der Phytasen ist abhängig vom pH-Wert, da die Ladungen und Interaktionen wichtiger Aminosäurereste im aktiven Zentrum durch den pH-Wert beeinflusst werden. So führt beispielsweise ein pH-Wert über 6,5 zu einer Deprotonierung des HD-Motivs im aktiven Zentrum der HAP. Dadurch kann das involvierte Aspartat nicht mehr als Protonendonor bei der Hydrolyse der Phosphatgruppen agieren woraufhin die Phytase inaktiviert wird (Ostanin et al. 1992; Oh et al. 2004; Ariza et al. 2013). Ebenso sind die Ladungen der Phosphatgruppen des $InsP_6$ pH-abhängig, so dass die Substrat-Löslichkeit und somit die Verfügbarkeit für die Phytasen ebenfalls durch den pH-Wert beeinflusst wird (Adeola und Cowieson 2011).

Das pH-Aktivitätsprofil der meisten in dieser Arbeit untersuchten WT-Phytasen bewegte sich in einem pH-Bereich von 2,5-5,5. Die beiden Hybrid-Phytasen HHO und OHH zeigten mit einem pH-Aktivitätsprofil von 2,0-5,5 eine verbesserte Aktivität in einem sauren Milieu. Mit einem pH-Aktivitätsprofil von 2,5-6,0 zeigte auch die Variante OYB ein breiteres pH-Aktivitätsprofil als die WT-Phytasen. Aus diesem Grund können die Varianten Schwankungen des pH-Wertes im GIT der Nutztiere besser tolerieren und wären vermutlich länger aktiv als die untersuchten WT-Phytasen.

In der Regel liegt der pH-Wert im Muskelmagen von Geflügel zwischen 2,5-3,5 (Ravindran 2013). Variationen durch Spezies und Alter der Tiere sind möglich. Außerdem steigt der pH-Wert im GIT nach der Futteraufnahme und abhängig von der Rationszusammensetzung an. So ist Futterkalk beispielsweise in der Lage, den pH-Wert deutlich zu erhöhen (Lawlor et al. 2005; Selle et al. 2009). Nachdem die *Digesta* den Muskelmagen passiert hat, steigt der pH-Wert im Duodenum, Jejunum und Ileum sukzessive an. Gleichzeitig steigt der Anteil an negativen Ladungen des $InsP_6$, so dass es vermehrt zur Ausbildung von $InsP_6$-Komplexen mit Mineralien, AS und Proteinen kommt. Aufgrund des hohen Anteils an Ca in einer gewöhnlichen Ration für Nichtwiederkäuer, spielen vor allem unlösliche Ca-Phytat-Komplexe eine wesentliche Rolle *in vivo* wodurch der Phytatabbau gehemmt wird (Selle et al. 2009). Des Weiteren können auch andere positiv geladene Mineralien wie zum Beispiel Fe, Mn oder Zn unlösliche Komplexe mit $InsP_6$ bilden. Die entstehenden $InsP_6$-Komplexe können von Phytasen nicht mehr effektiv dephosphoryliert werden (Maenz et al. 1999). Außerdem können die unlöslichen Nährstoffe nicht verstoffwechselt werden und gehen verloren.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von $InsP_6$ bei steigenden pH-Werten, der Ausbildung von $InsP_6$-Komplexen und einer limitierten Phytaseaktivität von HAP bei pH-Werten über 6,0 beschränkt sich der effektive $InsP_6$-Abbau auf den oberen Bereich des GIT von Nichtwiederkäuern. Verfügt die Phytase über eine schwache Aktivität bei einem niedrigen pH-Wert oder wird inaktiviert, so kann das

$InsP_6$ *in vivo* nicht effektiv abgebaut werden. Ein pH-Aktivitätsprofil von 2,0-6,0 wäre für einen effektiven $InsP_6$-Abbau *in vivo* daher vorteilhaft.

6.2.3 Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau

Damit Phytasen im GIT nicht inaktiviert werden, benötigen sie eine hohe Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen wie Pepsin und Pankreatin sowie eine hohe Stabilität bei niedrigen pH-Werten. Die direkte Inkubation einer Phytase mit Pepsin bei einem pH-Wert von 2,0-2,5 hat sich als ein aussagekräftiges Mittel erwiesen, die proteolytische Stabilität von Enzymen zu bewerten (Greiner et al. 2007a; Huang et al. 2008). Die Restaktivitäten einiger bakterieller Phytasen, die in *Digesta*-Überständen von unterschiedlichen Segmenten des GIT von Legehennen und Broilern untersucht wurden, waren vergleichbar mit einer direkten Inkubation korrespondierender Proteasen (Greiner und Konietzny 2010). In einigen Fällen konnte außerdem gezeigt werden, dass die negativen Effekte auf die Phytaseaktivität bei einer Inkubation mit *Digesta*-Überständen geringer ausfielen als bei einer direkten Inkubation mit Pepsin (pH 2,0). Der genaue Grund dafür ist nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass die Anwesenheit von anderen Proteinen einen stabilisierenden Effekt erzeugen (Greiner und Konietzny 2010; Menezes-Blackburn et al. 2022).

Eine vollständige Inhibierung der Phytaseaktivität durch Pepsin konnte bei den Varianten OBH und BHB beobachtet werden. Die Variante HBH wurde ebenfalls stark durch Pepsin inhibiert, obwohl 2/3 des Phytasegens aus der *H. alvei*-Phytase stammt, welche eine hohe Pepsinresistenz besitzt. Die sequenziell sehr ähnliche Variante OHB zeigte nach der Inkubation mit Pepsin hingegen eine Restaktivität von 84 %. Interessant ist, dass die meisten Varianten mit einer hohen Anfälligkeit gegenüber Pepsin aus den *Biobricks* der *B. sp. GC21* WT-Phytase bestehen, welche ebenfalls über eine hohe Anfälligkeit gegenüber Pepsin verfügt. Diese Anfälligkeit gegenüber Pepsin konnte bereits in einer Studie von Yu et al. (2014) gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung für die geringe Restaktivität der Varianten könnten daher spezifische Pepsinbindestellen sein, die in den Sequenzen der ersten beiden *Biobricks* der Phytase aus *B. sp. GC21* lokalisiert sind.

Die Phytaseaktivität der Variante CCE wurde ebenfalls durch die Pepsininkubation negativ beeinflusst. Die sequenziell sehr ähnlichen Varianten ECC und ECE zeigten hingegen eine sehr hohe Pepsinresistenz von mindestens 95 %, vergleichbar zur WT-Phytase aus *E. coli*. Hier könnte möglicherweise eine Pepsinbindestelle im N-Terminus der *C. braakii*-Phytase für die höhere Anfälligkeit der Phytasen gegenüber Pepsin verantwortlich sein. Eine Studie zeigte, dass die proteolytische Spaltung von Pepsin bevorzugt an exponierten Schleifen auf der Moleküloberfläche erfolgt (Wyss et al. 1999). Pepsin ist eine saure Endopeptidase, die ein sequenzspezifisches Katalyseverhalten aufweist und bevorzugt Phenylalanin- und Leucin-Reste schneidet (Rawlings et al. 2016). Das Enzym ist bei einem niedrigen pH-Wert aktiv und besitzt seine höchste katalytische Aktivität bei einem pH-Wert von 2,0 sowie 37-42 °C (Qi et al. 2007). Aus diesem Grund ist es

möglich durch den gezielten Austausch von AS die Pepsinresistenz der Phytasen zu erhöhen (Niu et al. 2017). Weitere strukturelle Untersuchungen wären nötig, um mögliche Pepsinbindestellen in den *Biobricks* der Varianten mit einer geringen Pepsinresistenz zu identifizieren.

6.2.4 Toleranz gegenüber hohen Temperaturen

Die Rekombination der *Biobricks* aus den Organismen *H. alvei* und *O. proteus* führte bei einigen Varianten zu einer verbesserten Hitzetoleranz. So zeigten die Varianten HHO, OHH und OHO einen um 0,9-2,2 °C höheren IT-50 als die WT-Phytase aus *H. alvei*. Die Variante OHO verfügte mit einem Wert von 65,4 °C über die höchste Hitzetoleranz, obwohl 2/3 des Moleküls aus der *O. proteus* WT-Phytase stammen, die einen IT-50 von 60,4 °C besitzt. Vergleicht man die Sequenzen beider Phytasen, so besitzt die OHO Variante eine Sequenzhomologie zur *O. proteus* WT-Phytase von 88 %. Trotz der hohen sequenziellen Übereinstimmung lässt sich nur spekulieren, welche AS für die höhere Hitzetoleranz verantwortlich sind, da sich insgesamt zu viele AS unterscheiden.

Eine mögliche Erklärung ist, dass sich durch die Rekombination der *Biobricks* aus unterschiedlichen Phytasegenen die Interaktionen zwischen einigen Proteindomänen verstärkt haben oder neue gebildet wurden. Dies könnte die Enzymstabilität verbessern haben. Eine andere Erklärung wäre ein verbessertes „*Refolding*“ der Phytase nach erfolgter Hitzeinkubation (Wyss et al. 1998).

Im Allgemeinen kann die Temperaturstabilität von Proteinen durch das Einfügen von Wasserstoff-, Salz- und Disulfidbrücken verbessert werden. Des Weiteren tragen verstärkte hydrophobe Interaktionen, Glykosylierungen, oder die Stabilisierung von Proteinschleifen und flexiblen Fragmenten dazu bei, die Temperaturstabilität eines Proteins zu erhöhen (Sanchez-Romero et al. 2013; Chen et al. 2015). Der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierungen, kann in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da für alle Phytasen ein bakterielles Expressionssystem verwendet wurde. Auch sind bei der Rekombination der *Biobricks* aus *O. proteus* und *H. alvei* keine zusätzlichen Disulfidbrücken entstanden. Relevanter könnte hingegen der Effekt von zusätzlichen Wasserstoffbrücken sein. So besitzt die Variante OHO an den Positionen H111D, A155E, N173D, N190D und N247D im Vergleich zur WT-Phytase vermehrt saure AS, die über Wasserstoffbrücken verschiedene Sekundärstrukturelemente stabilisieren könnten.

Eine verbesserte Thermostabilität von Phytasen durch das Einfügen von Wasserstoffbrücken konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden. So besitzt die Phytase AnphyA mit Mutationen der Seitenketten A35E und P42S eine 20 % höhere Restaktivität bei 100 °C (Zhang et al. 2007). Die Substitution von K46E und K65E im Gen einer *E. coli*-Phytase zeigte eine um 20 % höhere Thermostabilität bei 80 °C (Kim und Lei 2008).

Im Allgemeinen befinden sich hydrophile AS auf der Proteinoberfläche, wo die Interaktionen meist über Wasserstoffbrücken verstärkt werden können. Der Proteinkern ist hingegen unpolar. Hier kann

die Proteinfaltung durch die Ausbildung von neuen hydrophoben Bindungen stabilisiert werden. So führte der gezielte Aminosäuren-Austausch von S392F in einer *E. coli*-Phytase zu einer stabileren Bindung zu W347. In diesem Fall konnte mit nur einer Mutation die Thermostabilität des Enzyms im Vergleich zur WT-Phytase deutlich erhöht werden (Fakhravar und Hesampour 2018).

Am besten lässt sich die höhere Hitzetoleranz der Varianten OHH, HHO, OHO und OOH mit einer Verstärkung von hydrophoben Interaktionen im Proteinkern und eine Stabilisierung durch zusätzliche Wasserstoffbrücken erklären. Nichtsdestotrotz ist es notwendig die Thermostabilität der Hybrid-Phytasen weiter zu optimieren, um die hohen Temperaturen, die bei der Pelletierung des Futtermittels entstehen, ohne größeren Aktivitätsverlust tolerieren zu können.

6.3 $InsP_6$-Abbau *in vitro*

Bei allen untersuchten 6-Phytasen konnte gezeigt werden, dass das $InsP_6$ bei einem pH-Wert von 3,0 trotz einer vergleichbaren Phytaseaktivität, effizienter dephosphoryliert werden konnte als bei einem pH-Wert von 5,5. Das lag vor allem an einer hohen Akkumulation des Ins(1,2,5,6)P_4-Isomers, welches bei einem pH-Wert von 5,5 eine Art Flaschenhals im $InsP_6$-Abbau bildete. Bei einem pH-Wert von 3,0 konnte das Ins(1,2,5,6)P_4 hingegen innerhalb von 100 min Inkubationszeit dephosphoryliert werden, so dass im Gegensatz zu pH 5,5 keine $InsP_4$-Konzentrationen mehr nachweisbar waren.

Vergleicht man den Phytatabbau der untersuchten Phytasen bei einem pH-Wert von 3,0 miteinander, so zeigten die Phytasen aus *H. alvei*, *O. proteus*, *Y. intermedia* und *B. sp. GC21* sowie deren abgeleitete Varianten eine effizientere Dephosphorylierung der gebildeten $InsP_x$ als die Phytasen aus *E. coli*, *E. sp. biph 1* und *C. braakii* inklusive ihrer abgeleiteten Varianten ECC, CCE und ECE. Letztere zeigten nach einer vergleichbaren Reaktionszeit noch hohe Ins(1,2,5,6)P_4-Konzentrationen.

Eine hohe Akkumulation des Ins(1,2,5,6)P_4-Isomers, konnte in den hier durchgeführten *in vitro*-Versuchen bestätigt werden. Die größten Unterschiede bezüglich der gemessenen $InsP_x$-Konzentrationen zwischen den untersuchten Phytasen, konnten in dem *in vitro*-Modell mit der Futtermatrix F1 und einer Enzymkonzentration von 1000 FTU/g gezeigt werden. Während das $InsP_{4x}$ von den meisten der getesteten Phytasen hier vollständig dephosphoryliert werden konnte, wurden bei den WT-Phytasen aus *C. braakii* und *E. coli* sowie den Varianten CCE und ECC hohe Ins(1,2,5,6)P_4-Konzentrationen nachgewiesen.

Die Akkumulation von Ins(1,2,5,6)P_4 durch die WT-Phytasen aus *E. coli* und *C. braakii* konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden (Lim et al. 2000; Greiner et al. 2007b; Pontoppidan et al. 2012; Ariza et al. 2013; Kempapidis et al. 2020). In der Studie von Kempapidis et al. (2020) konnte über eine Echtzeitmessung des $InsP_6$-Abbaus mit einer *C. braakii*-Phytase nachgewiesen werden, dass $InsP_6$, $InsP_5$ und $InsP_3$ schneller dephosphoryliert werden konnten als $InsP_4$ und $InsP_2$. Das $InsP_1$ konnte hingegen nicht abgebaut werden und wurde von der Phytase akkumuliert.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte bereits Wyss et al. (1999) mit einer *E. coli*-Phytase. Hier konnte ebenfalls die Akkumulation von $InsP_4$ und eine geringe Hydrolyserate von $InsP_2$ nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung bietet die hohe Substratspezifität der Phytasen gegenüber $InsP_6$, die mit einer hohen spezifischen Aktivität einhergeht. Das aktive Zentrum ist optimal an $InsP_6$ angepasst, was eine schnelle Hydrolyse der ersten Phosphatgruppen ermöglicht. Aus diesem Grund stellen weniger phosphorylierte $InsP_x$ (wie $InsP_{1-4}$), schlechtere Substrate dar und können weniger effizient abgebaut werden, so dass es zu einer Akkumulation bestimmter $InsP_x$ kommen kann (Wyss et al. 1999; Greiner und Konietzny 2010).

Die Interaktionen von $InsP_6$ und den verschiedenen $InsP_x$ zum aktiven Zentrum einer HAP basieren auf elektrostatischer Anziehung. Durch jede abgespaltene Phosphatgruppe wird die negative Ladung von $InsP_6$ weiter reduziert, was wiederum die Assoziationskonstante der Abbauprodukte verringert (Krempaptidis et al. 2020). Die Affinität der Substrate zum aktiven Zentrum nimmt in der Reihenfolge $InsP_6$>$InsP_5$>$InsP_4$>$InsP_3$>$InsP_2$>$InsP_1$ ab. So wird das $InsP_6$ und $InsP_5$ von Phytasen mit hoher Substratspezifität bevorzugt gebunden und hydrolysiert. Dadurch, dass das $InsP_4$ langsamer dephosphoryliert wird, aber eine höhere Affinität zum aktiven Zentrum besitzt als $InsP_3$, kommt es zu einer Akkumulation von $InsP_4$ (Krempaptidis et al. 2020).

Das $InsP_2$ besitzt durch die zwei verbliebenen Phosphatgruppen nur noch eine schwache Ladung und daher eine geringe Affinität zum aktiven Zentrum. Aus diesem Grund wird das $InsP_2$ nur sehr langsam dephosphoryliert. Die Assoziation von $InsP_1$ zum aktiven Zentrum ist hingegen so gering, dass es in der Regel von bekannten Phytasen nicht dephosphoryliert werden kann (Greiner und Konietzny 2010; Menezes-Blackburn et al. 2022). Phytasen mit einem breiteren Substratspektrum, wie aus *A. fumigatus, E. nidulans* und *M. thermophila* besitzen zwar eine geringe spezifische Aktivität, können dafür aber viele unterschiedliche $InsP_x$ effektiv dephosphorylieren, so dass es nicht zu einer Akkumulation von Zwischenprodukten kommt (Wyss et al. 1999). Je höher die spezifische Aktivität für $InsP_6$, desto geringer sind möglicherweise die Hydrolyseraten niederer $InsP_x$. Diese Hypothese müsste durch weiterführende Untersuchungen überprüft werden.

Neben der Akkumulation von Ins(1,2,5,6)P_4 konnte ein weiterer interessanter Unterschied im $InsP_6$-Abbau der untersuchten Phytasen beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass die WT-Phytasen aus *E. coli, C. braakii und E. sp. biph 1* bevorzugt das Ins(1,2,5,6)P_4-Isomer bildeten. Ebenso bildeten die Varianten CCE, ECC sowie ECE fast ausschließlich das Ins(1,2,5,6)P_4, wohingegen die anderen Varianten und WT-Phytasen ähnliche Konzentrationen von beiden $InsP_4$-Isomeren bildeten. Die unterschiedliche Substratspezifität der Phytasen für $InsP_{4x}$ konnte sowohl bei der Analyse des $InsP_6$-Abbaus mit Na-Phytat als auch bei den *in vitro*-Versuchen mit komplexen Futtermatrices gezeigt werden. Die Präferenz für die Bildung von Ins(1,2,5,6)P_4 in Kombination mit einer geringen Hydrolyserate, könnte ein möglicher Erklärungsansatz für den langsameren $InsP_{4x}$-Abbau einiger der untersuchten Phytasen sein.

Wie stark sich die Hydrolyseraten zwischen den verschiedenen $InsP_4$-Isomeren unterscheiden, müssen weiterführende Experimente klären. Dazu wäre es erforderlich die spezifischen $InsP_x$ in ausreichenden Mengen zu produzieren, um sie als Substrate an einer Phytase testen zu können. Ein aussagekräftiges Maß für die Hydrolyseraten stellt die sogenannte *catalytic rate* (k_{cat}/k_m) dar. Dabei gibt die Wechselzahl (k_{cat}) an, wie viele Substratmoleküle durch das Enzym in einer bestimmten Zeit umgesetzt werden können und die Michaeliskonstante (k_m) ist ein Maß für die Substrataffinität unter katalytischen Bedingungen.

Die Unterschiede im $InsP_6$-Abbau waren zwischen den untersuchten Phytasen in dem verwendetem *in vitro*-Modell größer als bei der Analyse des $InsP_6$-Abbaus mit Na-Phytat. Ein Grund dafür waren vermutlich die anspruchsvolleren Reaktionsbedingungen durch wechselnde pH-Werte, die Verwendung von komplexen Futtermatrices und Zugabe proteolytischer Enzyme.

Da sich das chemisch synthetisierte Na-Phytat von dem natürlich vorkommenden $InsP_6$ unterscheidet, ist es erforderlich, die Phytasen an einer komplexen Futtermatrix zu testen, um ihre Effizienz realitätsgetreuer bewerten zu können. Je nach $InsP_6$-Quelle und weiteren Futtermittelbestandteilen kann der $InsP_6$-Abbau negativ beeinflusst werden (siehe 2.3.2). Zu den wichtigsten Einflussfaktoren zählt die $InsP_6$-Konzentration, die Löslichkeit von $InsP_6$, das Enzym:Substrat-Verhältnis sowie der Mineralstoffgehalt einer Ration. So sind zum Beispiel hohe Ca- und P-Konzentrationen nachweislich in der Lage, den $InsP_6$-Abbau sowohl *in vitro*- als auch *in vivo* negativ zu beeinflussen (Selle et al. 2009; Sommerfeld et al. 2018; Papp et al. 2022). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Auswahl der Hybrid-Phytasen an zwei unterschiedlichen Futtermatrices getestet.

Bei der Futtermatrix F1 wurden zwei unterschiedliche Phytasedosierungen eingesetzt, um zum einen den $InsP_6$-Abbau sowie den Abbau niederer $InsP_x$ vergleichen zu können. Dabei zeigte die Variante CCE den geringsten $InsP_6$-Abbau bei einer Dosierung von 100 FTU/g. Mit der 10x höheren Dosierung zeigte CCE die höchste Ins(1,2,5,6)P_4-Akkumulation und geringste $InsP_2$-Konzentration im Vergleich zu den anderen Hybrid-Phytasen und somit ein vergleichsweise wenig effizienten $InsP_6$- und $InsP_x$-Abbau.

Die Variante HOH zeigte hingegen die niedrigste $InsP_6$-Konzentration bei einer Dosierung von 100 FTU/g und zusammen mit der Variante OHH die höchsten gemessenen $InsP_2$-Konzentrationen bei gleichzeitig geringen $InsP_{3x}$-Konzentrationen und vollständigem Abbau beider $InsP_4$-Isomere. Demnach verfügten die Varianten über den effizientesten $InsP_6$-Abbau unter den Hybrid-Phytasen.

Da alle Phytasen mit einer vergleichbaren Aktivität bei einem pH-Wert von 5,5 eingesetzt wurden, lassen sich die Unterschiede im $InsP_6$-Abbau zwischen den untersuchten Phytasen anhand ihrer Substratspezifität, dem pH-Aktivitätsprofil, ihrer Enzymstabilität bei geringen pH-Werten und ihrer Resistenz gegenüber Pepsin erklären. Die Resistenz gegenüber Pankreatin spielt eine zu vernachlässigende Rolle, da die Phytaseaktivität der involvierten Phytasen in der Ileum-Phase des *in vitro*-Modells (pH 6,1) stark limitiert war. Die Varianten HOH und OHH besaßen zum Beispiel eine

hohe Resistenz gegenüber Pepsin und zeigten keine Akkumulation von Ins(1,2,5,6)P_4. Zudem verfügte die Variante OHH über ein pH-Aktivitätsprofil von 2,0-5,5 und die Variante HOH über ein pH-Optimum von 3,5. Alles Eigenschaften, welche einen effektiven Phytatabbau unter den gegebenen Reaktionsbedingungen erlauben. CCE hingegen zeigte bei der Inkubation mit Pepsin eine Restaktivität von nur 60 % und eine hohe Ins(1,2,5,6)P_4 Akkumulation sowohl mit Na-Phytat als auch im *in vitro*-Modell. Das pH-Aktivitätsprofil der Variante CCE lag bei 3,0-6,0.

Das pH-Spektrum der im *in vitro*-Modell simulierten Abschnitte des GITs reichte von einem pH-Wert von 2,8 (Magen) bis 6,1 (Ileum). Das $InsP_6$ kann daher effektiv von Phytasen abgebaut werden, die eine hohe Resistenz gegenüber Pepsin besitzen und über eine hohe Aktivität sowie Stabilität bei einem pH-Wert von 2,8 verfügen. Nach den untersuchten pH-Aktivitätsprofilen zu urteilen, zeigen die Varianten CCE und die WT-Phytase aus *C. braakii* bei einem pH-Wert von 2,8 weniger als die Hälfte ihrer maximalen Aktivität. Zusammen mit einer geringeren Resistenz gegenüber Pepsin könnte dies eine Erklärung für die signifikant höheren $InsP_6$-Konzentrationen und den langsameren $InsP_x$-Abbau im *in vitro*-Modell sein.

Das im Futtermittel enthaltene $InsP_6$ wurde von denjenigen Phytasen weniger effizient abgebaut, die das Ins(1,2,5,6)P_4 akkumulierten und über eine geringe Pepsinresistenz verfügten. So zeigten die WT-Phytasen aus *C. braakii* und *B. sp. GC21* zusammen mit der Variante CEE die geringsten $InsP_2$- sowie hohe $InsP_{3x}$- oder $InsP_{4x}$-Konzentrationen. Die Restaktivität nach einer direkten Pepsininkubation lag bei diesen Phytasen bei 8-60 %. Die pepsinresistente Variante ECC zeigte hingegen analog zur WT-Phytase aus *E. coli* signifikant höhere $InsP_2$- und niedrigere Ins(1,2,5,6)P_4-Konzentrationen und somit einen etwas effizienteren $InsP_6$-Abbau, trotz der bevorzugten Bildung und Akkumulation von Ins(1,2,5,6)P_4.

Einen anderen Aspekt stellt der Einfluss von futterbezogenen Faktoren auf den $InsP_6$-Abbau dar, welcher durch die unterschiedlichen Ergebnisse der *in vitro*-Versuche zwischen den Futtermatrices F1 und F2 sehr deutlich wurde. So konnte bei allen untersuchten Phytasen ein geringerer $InsP_6$-Abbau bei der Futtermatrix F2 festgestellt werden, obwohl diese eine höhere intrinsische Phytaseaktivität verfügte als die Futtermatrix F1. Auch bei einer sehr hohen Phytasedosierung von 1000 FTU/g konnte das in der Futtermatrix F2 enthaltene $InsP_6$ von keiner der untersuchten Phytasen vollständig dephosphoryliert werden. Dabei waren die allgemeinen Reaktionsbedingungen bei beiden Futtermatrices gleich. Hierzu zählten die pH-Werte sowie Inkubationszeiten der verschiedenen Phasen, die Temperatur und die verwendeten Pepsin- bzw. Pankreatinkonzentrationen. Die Futtermatrix F2 verfügte im Vergleich zu F1 über einen deutlich höheren Mineralstoffanteil und basierte auf einer Mischung aus Soja, Weizen- und Rapsextraktionsschrot. In Weizen und Raps ist der Hauptanteil des $InsP_6$ im Gegensatz zu Mais und Soja,, in der äußeren Aleuronschicht lokalisiert und aus diesem Grund weniger gut verfügbar (O´Dell et al. 1972). Trotz des feinen Mahlgrades der Futtermatrix, könnte das enthaltene $InsP_6$ für die exogenen Phytasen weniger gut zugänglich gewesen

sein als es bei der Futtermatrix F1 der Fall war. Dafür spricht, dass selbst eine sehr hohe Phytasedosierung von 1000 FTU/g nicht ausreichte, das $InsP_6$ vollständig zu dephosphorylieren, obwohl das Enzym:Substrat-Verhältnis ausreichend hoch war. Ein verminderter $InsP_6$-Abbau bei Raps und Weizen konnte bereits in einigen *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien gezeigt werden (Newkirk und Classen 1998; Blaabjerg et al. 2010a; Siegert et al. 2019).

Eine weitere Erklärung für den geringen $InsP_6$-Abbau könnte auch eine schlechte $InsP_6$-Löslichkeit aufgrund der hohen Mineralstoffkonzentration sein. Das Ca:P-Verhältnis war in der Futtermatrix F2 zum Beispiel mehr als doppelt so hoch als in der Futtermatrix F1. Vor allem in der Kropf- und Ileum-Phase des *in vitro*-Modells ist die Bildung von unlöslichen Ca-Phytat-Komplexen plausibel, da hier der pH-Wert mit 5,7 bzw. 6,1 entsprechend hoch ist. Negative Effekte auf die Phosphatfreisetzung der WT-Phytase aus *E. coli* konnten im Rahmen dieser Arbeit mit $CaCl_2$ bereits ab einem pH-Wert $\geq$ 4,5 beobachtet werden. Bei einem pH-Wert $\geq$ 5,0 ist ein $InsP_6$-Molekül in der Lage 5-6 Ca^{2+} zu komplexieren, wodurch das $InsP_6$ nicht mehr effektiv dephosphoryliert werden kann (Selle et al. 2009). In der Magen-Phase des *in vitro*-Modells dürfte der Einfluss von Ca-Phytat-Komplexen auf den $InsP_6$-Abbau weniger stark ausgeprägt gewesen sein, da hier der pH-Wert bei 2,8 lag. Es ist jedoch möglich, dass während der Inkubationszeit der pH-Wert von 2,8 durch den Anteil an $CaCO_3$ im Futter sukzessive angestiegen ist.

In einem vergleichbaren *in vitro*-Modell konnte durch die Zugabe von mineralischem Ca- und P ein verminderter $InsP_6$-Abbau nachgewiesen werden (Sommerfeld et al. 2017; Papp et al. 2022). In der Studie von Papp et al. (2022) wurde der $InsP_6$-Abbau durch die Zugabe von MCP signifikant um 1/3 reduziert. Als Erklärung diente auch hier die Ausbildung von unlöslichen Ca-Phytat-Komplexen. Außerdem wurde eine mögliche Endproduktinhibierung der involvierten Phytasen durch das mineralische P diskutiert.

Neben Ca sind noch weitere divalente Kationen in der Lage unlösliche Komplexe mit $InsP_6$ zu bilden und somit den $InsP_6$-Abbau negativ zu beeinflussen. Die Konzentrationen von Fe, Mn und Zn spielen zwar gegenüber Ca mengenmäßig eine untergeordnete Rolle, besitzen zum Teil aber eine höhere Affinität zu $InsP_6$ (Vohra et al. 1965; Maenz et al. 1999). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mineralstoffverbindungen wie $MnSO_4$, $FeSO_4$ und $ZnSO_4$ die Pi-Freisetzung einer WT-Phytase aus *E. coli* stärker inhibieren können als $CaCl_2$. So reichten bereits geringere Konzentrationen aus, um unabhängig vom pH-Wert den $InsP_6$-Abbau zu reduzieren. Mit Zn und Fe konnte die Pi-Freisetzung der Phytase bereits bei einem pH-Wert von 3,0 inhibiert werden. Den größten Effekt zeigte hier $FeSO_4$. Bei einem pH-Wert von 5,5 wurde die Phosphatfreisetzung am stärksten durch $ZnSO_4$ reduziert. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Studie von Maenz et al. (1999). Hier hatte ebenfalls Zn den größten inhibitorischen Effekt auf die Pi-Freisetzung in einem *in vitro*-Modell, gefolgt von Fe und Mn. Den geringsten Auswirkungen zeigte hingegen Mg. Neben Ca, sollte der Effekt weiterer

Mineralstoffverbindungen auf den $InsP_6$-Abbau trotz geringerer Konzentrationen nicht unterschätzt werden.

Der $InsP_6$-Abbau in der Futtermatrix F2 wurde vermutlich durch eine Kombination aus mehreren futterbedingten Faktoren negativ beeinflusst. Zum einen ist hier die vermehrte Ausbildung von $InsP_6$-Komplexen durch die hohe Mineralstoffkonzentration zu nennen sowie eine schlechtere Substratverfügbarkeit des $InsP_6$ in Weizen und Raps. Außerdem könnte der hohe Anteil an Futterkalk den pH-Wert während der Inkubationszeiten beeinflusst haben.

6.4 $InsP_6$-Abbau *in vivo*

Zur ernährungsphysiologischen Evaluierung der Hybrid-Phytasen *in vivo* wurde sich zugunsten der OHO-Variante entschieden, da sie aus strategischen Gesichtspunkten mit ihren biochemischen Eigenschaften überzeugte. Ein wichtiges Kriterium war zum Beispiel die Hitzetoleranz der Phytase, da diese in jedem Fall weiter optimiert werden muss, um die hohen Temperaturen bei der Pelletierung des Futtermittels ohne größere Aktivitätsverluste zu tolerieren. Die OHO-Variante zeigte in dieser Arbeit die höchste Hitzetoleranz aller untersuchten WT- und Hybrid-Phytasen. Im Rahmen einer zukünftigen zielgerichteten Enzym-Optimierung, würde als erstes die Temperaturstabilität der Phytase verbessert werden. Um einen angestrebten IT-50 von 85 °C zu erreichen, wäre der Aufwand bei der OHO-Phytase daher am geringsten. Nichtsdestotrotz überzeugte die Variante auch mit ihrem effizienten Phytatabbau *in vitro*. Sie verfügt über eine hohe Stabilität sowie Aktivität bei geringen pH-Werten und ist resistent gegenüber proteolytischem Abbau.

Um das volle Potential der eingesetzten Phytasen in dem in dieser Arbeit durchgeführten Fütterungsversuch auszuschöpfen, wurde auf die Zugabe von MCP in den Versuchsrationen vollständig verzichtet. Die Versuchsrationen verfügten dementsprechend über eine verminderte Ca- und P-Konzentration, welche über den Einsatz der Phytasen in zwei Dosierungen kompensiert werden sollte. Die negativen Auswirkungen hoher Ca- und P-Konzentrationen auf den pc $InsP_6$-Abbau konnten nicht nur *in vitro* sondern ebenso *in vivo* nachgewiesen werden (Tamim und Angel 2003; Tamim et al. 2004; Selle et al. 2009; Zeller et al. 2015; Sommerfeld et al. 2018; Papp et al. 2022). In der Studie von Papp et al. (2022) konnten negative Auswirkungen auf den $InsP_6$-Abbau durch die Zugabe von MCP *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Bei hohen Ca- und P-Konzentrationen konnte ebenfalls ein reduzierter Abbau niederer $InsP_x$-Isomere *in vivo* gezeigt werden (Sommerfeld et al. 2018). Neben der Ausbildung von Ca-Phytat-Komplexen wird der pc $InsP_6$-Abbau *in vivo* vermutlich ebenso durch eine Inhibierung- und geringere Expression endogener Phytasen- sowie Phosphatasen beeinflusst (Selle et al. 2009; Sommerfeld et al. 2018).

In dieser Arbeit lag die pc P-Verdaulichkeit und der pc $InsP_6$-Abbau in der Basalration ohne den Zusatz einer exogenen Phytase bei 62,7-63,5 %. Dieses Ergebnis demonstriert das hohe biologische

Potential der Broiler, das im Futter enthaltene $InsP_6$ im oberen GIT abzubauen und das freigesetzte $InsP_6$-P zu verstoffwechseln, wenn Ca- und P-defiziente Rationen verfüttert werden. Das Ergebnis stimmt gut mit den Daten aus anderen Studien überein, bei denen ebenfalls Ca- und P-defiziente Rationen an Broilern getestet wurden (Rodehutscord und Rosenfelder 2016; Sommerfeld et al. 2018; Ingelmann et al. 2019).

Nichtsdestotrotz konnte die Nährstoffverdaulichkeit durch die Zugabe der OHO- sowie QB-Phytase signifikant erhöht werden. So führte eine Phytasedosierung von 1500 FTU/kg zu einer signifikanten Zunahme des pc $InsP_6$-Abbaus und der pc P-Verdaulichkeit gegenüber der Basalration, unabhängig von der eingesetzten Phytase. Dieses Ergebnis zeigt, dass das von den Phytasen freigesetzte $InsP_6$-P auch tatsächlich von den Broilern absorbiert werden konnte. Die erhöhte Nährstoffverdaulichkeit durch den Phytaseeinsatz spiegelte sich auch sehr gut in den Wachstumsdaten der Broiler wider. Die Zugabe beider exogenen Phytasen führte innerhalb der experimentellen Fütterungsperiode (Tag 11-21) zu einer dosisabhängigen Zunahme der ADG, G:F und dem Fußaschegehalt. Dabei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden eingesetzten Phytasen festgestellt werden.

Die ermittelten Fußaschegehalte stellen ein Maß für die Knochenmineralisierung der Broiler dar. Im Vergleich zu der Basalration führte die Zugabe der Phytasen zu einer signifikanten Zunahme des Fußaschegehaltes um bis zu 25,7 %. Dieses Ergebnis demonstriert, dass durch den $InsP_6$-Abbau mehr $InsP_6$-P den Tieren zur Verfügung stand, welches zusammen mit Ca zum Aufbau der Knochensubstanz genutzt werden konnte.

In einem ähnlichen Fütterungsversuch mit Broilern konnte in Abhängigkeit von der eingesetzten Ca- und P-Konzentration, ein pc $InsP_6$-Abbau zwischen 77-87 % nachgewiesen werden (Sommerfeld et al. 2018). In einer weiteren Studie wurde abhängig von der verwendeten organischen $InsP_6$-Quelle in einer Ca- und P-defizienten Ration ein pc $InsP_6$-Abbau zwischen 64-75 % nachgewiesen (Siegert et al. 2019). Beide Versuche zeigten bei einer Phytasedosierung von 1500 FTU/kg einen ähnlichen pc $InsP_6$-Abbau zu den in dieser Arbeit ermittelten Daten der Behandlungen OHO 1500 (75,3 %) und QB 1500 (83,3 %).

Der pc $InsP_6$-Abbau war in der Studie von Siegert et al. (2019) bei einer Behandlung auf Basis von Sojaextraktionsschrot mit 75 % am höchsten. Die Behandlung mit einer Ration bestehend aus Soja- und Rapsextraktionsschrot zeigte hingegen mit 68 % einen prozentual geringeren pc $InsP_6$-Abbau. Da die $InsP_6$-P-Konzentration in Raps allerdings höher ist als in Soja, könnte der absolute $InsP_6$-Abbau höher gewesen sein. Eine weitere plausible Erklärung für den geringeren pc $InsP_6$-Abbau könnte auch eine geringere $InsP_6$-Verfügbarkeit durch das verwendete Rapsextraktionsschrot sein. Wie bereits erwähnt, ist der Großteil des $InsP_6$ in Raps in der Aleuronschicht lokalisiert und aus diesem Grund schlechter zugänglich (Paloheimo et al. 2010). Demnach wäre es denkbar, dass aufgrund einer schlechteren $InsP_6$-Verfügbarkeit der pc $InsP_6$-Abbau negativ beeinflusst wurde

In dieser Arbeit wurde ebenfalls Rapsextraktionsschrot verwendet, um den tP-Anteil der experimentellen Versuchsration zu erhöhen. Dies war nötig, um den Nährstoffbedürfnissen der Broiler besser zu entsprechen, da auf die Zugabe von MCP verzichtet wurde. Ein negativer Einfluss auf den pc $InsP_6$-Abbau wäre auch in diesem Versuch denkbar.

Die $InsP_6$-Konzentrationen in der *Digesta* des Muskelmagens und terminalen Abschnitts des Ileums wurden durch den Phytaseeinsatz dosisabhängig reduziert. Die geringsten Konzentrationen konnten in den Behandlungen mit 1500 FTU/kg Phytase gemessen werden. Der unvollständige $InsP_6$-Abbau lässt sich womöglich durch die Substratverfügbarkeit oder ein zu geringes Enzym:Substrat-Verhältnis erklären.

In der ausschließlich auf Sojaextraktionsschrot basierten Ration der Studie von Siegert et al. (2019) konnte mit einer Phytasedosierung von 3000 FTU/kg ein pc $InsP_6$-Abbau von 92 % erzielt werden. Die Dosierung von 12500 FTU/kg in einer anderen Studie zeigte bei einer ähnlichen Versuchsration ein vergleichbares Ergebnis, obwohl eine deutlich höhere Phytasedosierung verwendet wurde (Zeller et al. 2015). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass ein Teil des $InsP_6$ im Futter unabhängig von der eingesetzten Phytasekonzentration für die Phytasen nicht verfügbar ist. Dies könnte unter anderem mit der geringen Fähigkeit von Broilern zu tun haben, Rohfaserbestandteile des Futters aufzuschließen oder durch die kurze Retentionszeit der *Digesta* bedingt sein (Kirchgeßner et al. 2014; Kristoffersen et al. 2021). Eine Möglichkeit die $InsP_6$-Verfügbarkeit zu erhöhen, wäre der Einsatz von Enzymen, die in der Lage sind Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) aufzuschließen, wie beispielsweise Xylanasen (Paloheimo et al. 2010). Mit Proteinen assoziiertes $InsP_6$ könnte durch die Zugabe von sauren Proteasen leichter zugänglich gemacht werden.

Interessanterweise konnten in der *Digesta* aus den verschiedenen Segmenten des GITs der Broiler nur sehr geringe $InsP_x$-Konzentrationen nachgewiesen werden. Auch in der Behandlung QB 1500 mit einem pc $InsP_6$-Abbau von 83,3 % konnten im terminalen Ileum nur $InsP_{4x}$-Konzentrationen von maximal 0,3 µmol/g gemessen werden. $InsP_3$-Isomere waren hier in keiner der Behandlungen nachweisbar. Die geringe Konzentration von Abbauprodukten des $InsP_6$ bis zum terminalen Ileum lässt auf eine effiziente Dephosphorylierung der $InsP_{1-5}$ im oberen GIT schließen. Das Ergebnis spricht für eine hohe endogene Phytase- und Phosphataseaktivität, was zusätzlich durch die signifikante Zunahme der MI-Konzentration in der *Digesta* des terminalen Ileums in den Behandlungen OHO 1500 und QB 1500 untermauert wird. Durch den Verzicht auf MCP in der experimentellen Versuchsration wurde vermutlich weniger Phytat komplexiert und konnte so effizienter dephosphoryliert werden. Außerdem könnte die verminderte P-Konzentration der Versuchsration zu einer höheren Phytase- sowie Phosphatase-Expression der Mukosa und Mikrobiota geführt haben.

Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Pontoppidan et al. (2012), bei der die *in vitro* beobachtete Akkumulation von $InsP_4$ einer *C. braakii*-Phytase in einem anschließenden *in vivo*-Experiment nicht

gezeigt werden konnte. Der vollständige $InsP_4$-Abbau im Ileum wurde in der Studie mit der Anwesenheit endogener Phosphatasen begründet.

Der Großteil des im Versuchsfutter enthaltenen organischen $InsP_6$ konnte in den Behandlungen OHO 1500 und QB 1500 mit Hilfe endogener Phytasen- sowie Phosphatasen im GIT der Broiler effizient bis zum MI abgebaut werden. Dabei könnte der Verzicht auf MCP dazu beigetragen haben, dass das $InsP_6$ und seine Abbauprodukte effizienter von den exogenen sowie endogenen Phytasen dephosphoryliert werden konnte.

7 Ausblick

In dem Fütterungsversuch konnte erfolgreich demonstriert werden, dass die neu entwickelte Hybrid-Phytase über eine gute Stabilität und hohe Aktivität *in vivo* verfügt. Sie war in der Lage, die Futtereffizienz und Leistungsdaten der Broiler signifikant zu erhöhen. Dabei zeichnete sich die Hybrid-Phytase über gute biochemische Eigenschaften, wie ein breites pH-Aktivitätsprofil, eine hohe spezifische Aktivität und einen effizienten $InsP_6$-Abbau ohne nachweisbare Akkumulation von $InsP_4$-Isomeren aus. Nichtsdestotrotz waren weder die Hybrid-Phytase noch die kommerzielle Phytase in der Lage das $InsP_6$ vollständig abzubauen. Um den $InsP_6$-Abbau zu maximieren, besteht daher weiterer Entwicklungs- und Forschungsbedarf, sowohl was das Verständnis für die Funktion- und Limitation der Phytasen *in vivo* angeht als auch für eine optimale Futterzusammensetzung und Dosierung der Phytasen. Die in dieser Arbeit erzeugten Hybrid-Phytase stellen eine gute Basis für weitere Enzym-Optimierungsprojekte dar. Denkbar wäre zum Beispiel die Hitzeresistenz der Hybrid-Phytasen durch einen zielgerichteten rationalen Ansatz sukzessive zu verbessern, indem man bestimmte AS austauscht, um eine höhere strukturelle Stabilität zu erzeugen. Ebenso wären eine verbesserte spezifische Aktivität, die Minimierung der Akkumulation von $InsP_{2\text{-}3}$-Isomeren sowie ein breiteres pH-Aktivitätsprofil mögliche Entwicklungsziele.

Trotz der langen Historie der Phytaseforschung von über 125 Jahren bleibt der $InsP_6$-Abbau bei Nichtwiederkäuern bis heute unvollständig. Einen Grund stellt die Überversorgung der Tiere mit Nährstoffen, wie Ca und P, dar, die sich negativ auf den $InsP_6$-Abbau *in vivo* auswirkt. Mit hohen Phytase-Dosierungen können heutzutage bis zu 90 % des im Futter enthaltenen $InsP_6$ im Verdauungstrakt abgebaut werden. Trotzdem werden oft Inositolphosphate mit 4 oder weniger Phosphatgruppen *in vivo* nicht effektiv von exogenen Phytasen dephosphoryliert. Die Gründe für die Akkumulation oder metabolische Auswirkungen der Abbauprodukte von $InsP_6$ sind bis heute kaum verstanden. Weitere Forschung in diesem Bereich trägt dazu bei, die Nachhaltigkeit der Nutztierhaltung zu verbessern, indem die verfügbaren organischen Nährstoffe effizienter genutzt und limitierte Ressourcen geschont werden.

8 Zusammenfassung

Aufgrund von ökologischen sowie ökonomischen Aspekten nimmt die Relevanz einer nachhaltigeren Nutztierhaltung zu. Es werden wertvolle Futterphosphate benötigt, um die Nährstoffbedürfnisse von Nichtwiederkäuern zu decken, da der organische Phosphatspeicher der pflanzlichen Futtermittel von den Tieren nicht vollständig erschlossen werden kann. Die Substitution mineralischer Phosphor-Verbindungen durch Phytasen ermöglicht die Schonung limitierter Rohphosphate, die Unabhängigkeit gegenüber steigenden Preisen für Phosphor-Verbindungen und die Reduzierung der Phosphor-Ausscheidung von Nichtwiederkäuern. Gleichzeitig können so auch negative Umweltauswirkungen durch zu hohe Phosphor-Einträge in Gegenden intensiver Nutztierhaltung minimiert werden. Steigende Kosten für Futtermittel und Rohphosphate sowie die Festlegung von Grenzwerten für Phosphor-Einträge in die Umwelt sind treibende Faktoren, welche den Einsatz und die Nachfrage von Phytasen steigen lassen.

Um den organischen Phosphatspeicher bestmöglich zu erschließen, ist es notwendig, die Phytaseeffizienz *in vivo* zu erhöhen. Dabei helfen sowohl ein besseres Verständnis für die Einflussfaktoren, welche den Phytatabbau *in vivo* limitieren, als auch eine stetige Verbesserung der biochemischen Eigenschaften von Phytasen, um an die Bedingungen im Verdauungstakt der Nichtwiederkäuer bestmöglich angepasst zu sein. Das Hauptziel der Arbeit war daher, mit Hilfe einer gerichteten Rekombination bekannter Phytasegene eine Vielzahl sequenziell neuartiger Hybrid-Phytasen zu erzeugen, welche die biochemischen Eigenschaften der eingesetzten Wildtyp-Phytasen übertreffen. Im Fokus dieser Arbeit stand dabei die biochemische- und ernährungsphysiologische Bewertung der neu erzeugten Hybrid-Phytasen hinsichtlich ihrer Eignung als Futterzusatz. Dabei lässt sich dieses Projekt grob in die folgenden Abschnitte gliedern:

1. Auswahl und biochemische Charakterisierung der Wildtyp-Phytasen
2. Herstellung der Rekombinationsbibliothek und Durchmusterung nach aktiven Hybrid-Phytasen
3. Biochemische Charakterisierung der Hybrid-Phytasen
4. *In vitro* Evaluierung ausgewählter Hybrid-Phytasen an verschiedenen Futtermatrices
5. Auswahl und Evaluierung einer Hybrid-Phytase *in vivo*

Als Grundlage für die Rekombination dienten die Phytasegene der folgenden Bakterien: *Buttiauxiella sp. GC21, Citrobacter braakii, Dickeya paradisiaca, Enterobacter sp. biph1, Escherichia coli, Hafnia alvei, Obesumbacterium proteus* und *Yersinia intermedia.* Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Wildtyp-Phytasen wurden aufgrund ihrer zum Teil sehr guten biochemischen Eigenschaften und ihres ähnlichen strukturellen Aufbaus ausgewählt. Wichtige Eigenschaften, die charakterisiert wurden, sind die Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen wie Pepsin, das pH-Aktivitätsprofil, die spezifische

Aktivität, der Phytat-Abbauweg sowie die Stabilität bei niedrigen pH-Werten und hohen Temperaturen.

Die Wildtyp-Phytasegene wurden in jeweils drei Fragmente unterteilt und miteinander rekombiniert, so dass theoretisch 504 modifizierte Phytasen entstehen konnten. Von 504 möglichen Hybrid-Phytasen wurden insgesamt 24 unterschiedliche Varianten mit einer Aktivität auf Wildtyp-Niveau identifiziert und analog zu den Wildtyp-Phytasen biochemisch charakterisiert. Einige der Hybrid-Phytasen zeigten zum Teil bessere biochemische Eigenschaften als die Wildtyp-Phytasen. So verfügte eine Variante über eine um 2,2 °C höhere Hitzetoleranz. Bei mehreren Varianten konnte ein leicht ins saure Milieu verschobenes pH-Aktivitätsprofil beobachtet werden sowie eine Verschiebung des pH-Optimums von 4,5 auf 3,5.

Alle untersuchten Hybrid-Phytasen zeigten bei einem pH-Wert von 3,0 einen effizienteren $InsP_6$-Abbau als bei einem pH-Wert von 5,5, obwohl die eingesetzte Phytaseaktivität bei beiden pH-Werten gleich war. Während das $InsP_6$ in vielen Fällen bei einem pH-Wert von 3,0 bis zum $InsP_{1-2}$ dephosphoryliert wurde, kam es bei einem pH-Wert von 5,5 zu einer Akkumulation des Ins(1,2,5,6)P_4-Isomers. Die Akkumulation von $InsP_4$-Isomeren konnte sowohl mit Natrium-Phytat als auch mit natürlichem Phytat in komplexen Futtermatrices gezeigt werden. Mögliche Ursachen für die Akkumulation bei pH 5,5 ist vermutlich eine schlechtere Löslichkeit, die Komplexbildung mit positiv-geladenen Ionen oder eine geringere Affinität niederer Inositolphosphat-Isomere zum aktiven Zentrum der untersuchten Phytasen, bedingt durch eine höhere negative Ladung der Moleküle im Vergleich zu einem pH-Wert von 3,0.

In einem *in vitro* Modell, das den Verdauungstrakt von Broilern simuliert, zeigten vor allem Hybrid-Phytasen mit einer hohen sequenziellen Homologie zur *E. coli*- und *C. braakii*-Phytase eine hohe Akkumulation von $InsP_4$-Isomeren. Interessant war, dass diese Phytasen bevorzugt das Ins(1,2,5,6)P_4-Isomer bildeten. Andere Hybrid-Phytasen konnten hingegen alle $InsP_4$-Isomere abbauen und bildeten zum Teil hohe $InsP_2$-Konzentrationen. Hauptgrund für die unterschiedliche Effizienz des Phytatabbaus *in vitro* könnten unterschiedliche biochemische Eigenschaften, wie die Pepsinresistenz oder ein anderes pH-Aktivitätsprofil sein. Vermutlich können aber auch unterschiedliche Präferenzen der Phytasen für bestimmte Abbauprodukte des Phytats die Effizienz des Phytatabbaus beeinflusst haben.

In einem weiteren *in vitro*-Versuch mit einer komplexen Futtermatrix, bestehend aus Soja- und Rapsextraktionsschroten sowie Weizen mit einem hohen Mineralstoffanteil, konnte der negative Einfluss von bestimmten futterbezogenen Faktoren auf die Phytase-Effizienz veranschaulicht werden. Das im Futter enthaltene $InsP_6$ wurde von allen eingesetzten Phytasen deutlich schlechter abgebaut als bei einer Futtermatrix auf Mais- und Sojabasis mit einem geringen Mineralstoffgehalt. Während eine Hybrid-Phytase das $InsP_6$ der Futtermatrix basierend auf Mais und Soja bis zum $InsP_3$-Isomer vollständig dephosphorylieren konnte und hohe $InsP_2$-Konzentrationen bildete, waren bei Verwendung der komplexeren Futtermatrix noch $InsP_6$-Konzentrationen nachweisbar, trotz ansonsten identischer Reaktionsbedingungen. Der geringere $InsP_6$-Abbau lässt sich vermutlich durch die hohen Calcium-

Konzentrationen sowie einer geringeren Verfügbarkeit des $InsP_6$ in Weizen und Raps gegenüber Mais und Soja erklären. Bei hohen Mineralstoffgehalten kommt es vermehrt zur Ausbildung von $InsP_6$-Komplexen mit divalenten Kationen. Hinzu kommt eine geringere $InsP_6$-Verfügbarkeit durch die Lokalisation des $InsP_6$ in der Aleuronschicht von Raps und Weizen, welche nur schlecht aufgeschlossen werden kann.

In einem abschließenden Fütterungsversuch mit 440 männlichen Broilern wurde eine der Hybrid-Phytasen gleichzeitig mit einer kommerziellen Phytase in je zwei Dosierungen (500- und 1500 FTU/kg) eingesetzt, um ihre Eignung als Futterzusatz bewerten zu können (Versuchstag 11-21, n=8 Abteile pro Behandlung mit je 11 Broilern). Es wurde ein Versuchsfutter auf Mais- und Sojabasis und ohne Zulage von Monocalciumphosphat verwendet, um einen möglichst effizienten Phytatabbau zu erreichen. Die Zulage der Hybrid-Phytase führte zu einer dosisabhängigen Zunahme der Leistungsdaten der Broiler und verbesserte die Futtereffizienz im Vergleich zu der Basalration ohne Enzymzugabe signifikant. Außerdem konnte der Fußaschegehalt bei einer Dosierung von 1500 FTU/kg Phytase um 21,6 % erhöht werden, was für eine deutlich verbesserte Knochenmineralisierung durch das freigesetzte $InsP_6$-Phosphat spricht. Durch die Analyse der $InsP_6$-Konzentration und dessen Abbauprodukte in verschiedenen Segmenten des Verdauungstraktes konnte ein effizienter $InsP_6$-Abbau *in vivo* beobachtet werden. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Versuchen konnte zum Beispiel keine Akkumulation von $InsP_{3-4}$-Isomeren nachgewiesen werden. Neben einer hohen exogenen Phytaseaktivität spricht dieses Ergebnis ebenso für eine hohe endogene Phytase- sowie Phosphataseaktivität im Verdauungstrakt der Broiler. Es ist anzunehmen, dass der Verzicht auf MCP in den experimentellen Versuchsrationen die Expression endogener Phytasen- sowie Phosphatasen begünstigt haben könnte. Diese Vermutung wird durch den pc $InsP_6$-Abbau *in vivo* bestätigt, welcher in der Basalration ohne Phytasezugabe bei 63,5 % lag. Nichtsdestotrotz konnte die Zugabe der Hybrid-Phytase den pc $InsP_6$-Abbau auf 76,3 % signifikant erhöhen. Die hohe Phytaseeffizienz spiegelte sich auch in der gemessenen pc Phosphor-Verdaulichkeit wider, die im Vergleich zur Basalration um 6,8 % erhöht wurde. Die eingesetzte kommerzielle Phytase zeigte eine vergleichbare Verbesserung der Leistungsdaten der Broiler wie die nicht optimierte Hybrid-Phytase.

In diesem Projekt wurde eine Vielzahl sequenziell einzigartiger Hybrid-Phytasen durch die Rekombination bekannter Wildtyp-Phytasegene entwickelt, welche in einigen relevanten Aspekten die biochemischen Eigenschaften der Wildtyp-Phytasen übertrafen. Einige der Phytasen zeigten bei der Simulation des Verdauungstraktes von Broilern *in vitro* einen sehr effizienten Phytatabbau. Ebenso konnte die Eignung der getesteten Hybrid-Phytase als Futterzusatz anhand der gesteigerten Leistungsdaten der Broiler nachgewiesen werden. Die höheren Leistungsdaten der Broiler konnten auf einen effizienten Phytatabbau zurückgeführt werden. Um einen maximalen $InsP_6$-Abbau zu erreichen, müssen die futterbedingten- und tierbezogenen Faktoren auf die Phytaseeffizienz *in vivo* noch besser verstanden und die $InsP_6$-Verfügbarkeit erhöht werden.

9 Summary

Due to ecological and economic aspects, the relevance of more sustainable livestock production becomes more important. Feed phosphates are needed to meet the nutritional requirements of non-ruminants, because the organic phosphate storage of plant-based feed cannot be fully utilized by the animals. The substitution of feed phosphates by phytases allows for the conservation of limited rock phosphates, independency from increasing prices for phosphorus compounds and the reduction of phosphorus excretion by non-ruminants. Negative environmental impacts caused by excessive phosphorus inputs in areas of intensive livestock production can be minimized. Rising costs for feed- and rock phosphates as well as limits for phosphorus inputs into the environment are driving factors that increase the use and demand of phytases.

To degrade the organic phosphate storage in the best possible way, it is necessary to increase phytase efficiency *in vivo*. Both a better understanding of the influencing factors limiting phytate degradation *in vivo* and a continuous improvement of the biochemical properties of phytases to be best adapted to the conditions in the digestive tract of non-ruminants will help to achieve this. Therefore, the main objective of this work was the generation of a large number of sequentially unique hybrid phytases by directed recombination of known phytase genes with the goal to achieve improved biochemical properties compared to the wild-type phytases used. The focus of this work was the biochemical and nutritional evaluation of the newly generated hybrid phytases with respect to their suitability as feed supplements. This project can be divided into the following sections:

1. Selection and biochemical characterization of the wild-type phytases.
2. Preparation of the mutant library and screening for active hybrid phytases
3. Biochemical characterization of the hybrid phytases
4. *In vitro* evaluation of selected hybrid phytases on different feed matrices
5. Selection and *in vivo* evaluation of one hybrid phytase

The phytase genes of the following bacteria served as the basis for recombination: *Buttiauxiella sp. GC21, Citrobacter braakii, Dickeya paradisiaca, Enterobacter sp. biph1, Escherichia coli, Hafnia alvei, Obesumbacterium proteus* and *Yersinia intermedia*. The wild-type phytases used in this work were selected because of their excellent biochemical properties in some cases and their similar structural design. Important properties that were characterized include resistance to proteolytic enzymes such as pepsin, pH activity profile, specific activity, phytate degradation pathway, and stability at low pH as well as at high temperatures.

The wild-type phytase genes were divided into three fragments and recombined with each other, theoretically resulting in 504 modified phytases. Of 504 possible hybrid phytases, a total of 24 different variants with wild-type level activity were identified and biochemically characterized in

analogy to the wild-type phytases. Some of the hybrid phytases showed better biochemical properties than the wild-type phytases. For example, one variant had a 2.2 °C higher temperature tolerance. In several variants, a pH profile shifted to an acidic environment was observed, as well as a shift of the pH optimum from 4.5 to 3.5.

All hybrid phytases examined showed more efficient $InsP_6$ degradation at pH 3.0 than at pH 5.5, although the phytase activity supplemented was the same at both pH values. While $InsP_6$ was dephosphorylated to $InsP_{1-2}$ in many cases at pH 3.0, accumulation of the Ins(1,2,5,6)P_4 isomer occurred at pH 5.5. Accumulation of $InsP_4$ isomers was demonstrated with both sodium phytate and natural phytate in complex feed matrices. Possible causes for the accumulation at pH 5.5 are probably poorer solubility, complex formation with positively charged ions, or lower affinity of lower inositol phosphate isomers to the active site of the used phytases, due to a higher negative charge of the isomers compared to pH 3.0.

In an *in vitro* model simulating the digestive tract of broilers, hybrid phytases with high sequential homology to the *E. coli* and *C. braakii* phytase showed high accumulation of $InsP_4$ isomers. Interestingly, these phytases preferentially formed the Ins(1,2,5,6)P_4 isomer. In contrast, other hybrid phytases were able to degrade all $InsP_4$ isomers and in some cases high $InsP_2$ concentrations were observed. The main reason for the different efficiency of phytate degradation *in vitro* could be due to different biochemical properties, such as pepsin resistance or a different pH activity profile. However, it is also likely that different preferences of phytases for certain phytate degradation products may have influenced the efficiency of phytate degradation.

Another *in vitro* experiment with a complex feed matrix consisting of soybean meal, rapeseed meal, and wheat with a high mineral content, illustrated the negative influence of certain feed-related factors on phytase efficiency. $InsP_6$ present in the feed was significantly less degraded by all phytases used compared to a corn and soy-based feed matrix with a low mineral content. While a hybrid phytase was able to completely dephosphorylate the $InsP_6$ of the corn and soy-based feed matrix down to the $InsP_3$ isomer resulting in high $InsP_2$ concentrations, the $InsP_6$ were still detectable in the *in vitro* model with the more complex feed matrix and high mineral content, despite identical reaction conditions. The poorer $InsP_6$ degradation can probably be explained by the high calcium concentrations as well as a lower availability of $InsP_6$ in wheat and canola compared to corn and soybean. At high mineral contents an increased formation of $InsP_6$ complexes with divalent cations has often been shown. In addition, there is a lower $InsP_6$ availability due to the localization of $InsP_6$ in the aleurone layer of canola and wheat, which can only be poorly digested.

In a final feeding trial with 440 male broilers, one of the hybrid phytases was supplemented at two doses each (500 and 1500 FTU/kg) to evaluate its suitability as a feed supplement (trial day 11-21, n=8 pens per treatment with 11 broilers each). Also, a commercial phytase was included in the study design at the same doses setting the benchmark for phytase efficiency. A low-phosphorus experimental feed based on corn and soybean meal was used. The supplementation of the used hybrid

phytase resulted in a dose-dependent increase in broiler performance data such as daily weight gain, feed intake and significantly improved feed efficiency compared to the basal ration without enzyme supplementation. In addition, foot ash content was increased by 21.6% at a dose of 1500 FTU/kg phytase, indicating significantly improved bone mineralization due to the released $InsP_6$ phosphate. By analyzing $InsP_6$ concentration and its degradation products in different segments of the digestive tract, efficient $InsP_6$ degradation was observed. In contrast to the *in vitro* experiments, no accumulation of $InsP_{3\text{-}4}$ isomers could be detected in crop, gizzard or small intestine. In addition to a high exogenous phytase activity, this result also suggests a high endogenous phytase as well as phosphatase activity in the digestive tract of broilers. It can be assumed that the absence of monocalcium phosphate in the experimental rations may have induced the expression of endogenous phytases and phosphatases. This assumption is confirmed by the high precaecal $InsP_6$ degradation, which was 63.5% in the basal ration without phytase supplementation. Nevertheless, the used hybrid phytase significantly increased the precaecal $InsP_6$ degradation to 76.3%. The high phytase efficiency was also reflected in the measured precaecal phosphorus digestibility, which was increased by 6.8% compared to the basal ration. The commercial phytase used showed comparable improvement in broiler performance data to the non-optimized hybrid phytase.

This project demonstrated the development of a variety of sequentially unique hybrid phytases by recombination of known phytase genes, which exceeded the biochemical properties of the wild-type phytases in some relevant aspects. Some of the phytases showed very efficient phytate degradation when simulating the digestive tract of broilers *in vitro*. Also, the suitability of the tested hybrid phytase as feed additives was demonstrated by the increased performance data of broilers. The higher performance data of the broilers could be attributed to efficient phytate degradation. To achieve maximum $InsP_6$ degradation *in vivo*, the feed-related and animal-related factors on phytase efficiency need to be better understood.

10 Literaturverzeichnis

Adeola, O.; Cowieson, A. J. (2011): Board-Invited Review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. In: *Journal of Animal Science* 89 (10), S. 3189–3218. DOI: 10.2527/jas.2010-3715.

Agranoff, B. W. (2009): Turtles All the Way: Reflections on *myo*-Inositol. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (32), S. 21121–21126. DOI: 10.1074/jbc.X109.004747.

Angel, R.; Tamim, N. M.; Applegate, T. J.; Dhandu, A. S.; Ellestad, L. E. (2002): Phytic acid chemistry: Influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. In: *Journal of Applied Poultry Research* 11 (4), S. 471–480. DOI: 10.1093/japr/11.4.471.

AOAC (2000): Method 2000.12: Phytase activity in feed. Colorimetric enzymatic method. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*.

Ariza, A.; Moroz, O. V.; Blagova, E. V.; Turkenburg, J. P.; Waterman, J.; Roberts, S. M. et al. (2013): Degradation of phytate by the 6-phytase from *Hafnia alvei*. A combined structural and solution study. In: *PloS one* 8 (5), e65062. DOI: 10.1371/journal.pone.0065062.

Augspurger, N. R.; Spencer, J. D.; Webel, D. M.; Baker, D. H. (2004): Pharmacological zinc levels reduce the phosphorus-releasing efficacy of phytase in young pigs and chickens. In: *Journal of Animal Science* 82 (6), S. 1732–1739. DOI: 10.2527/2004.8261732x.

Babatunde, O. O.; Bello, A.; Dersjant-Li, Y.; Adeola, O. (2021): Evaluation of the responses of broiler chickens to varying concentrations of phytate phosphorus and phytase. I. Starter phase (day 1-11 post hatching). In: *Poultry Science* 100 (10), S. 101396. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101396.

Barrientos, L.; Scott, J. J.; Murthy, P. P. (1994): Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. In: *Plant Physiology* 106 (4), S. 1489–1495. DOI: 10.1104/pp.106.4.1489.

Bertau, M.; Fröhlich, P.; Gellermann, C.; Maurer, A.; Vohrer, U.; Wendler, K. (2017): Phosphatrückgewinnung. Statuspapier der ProcessNet-Fachgruppe Rohstoffe. Online verfügbar unter: https://dechema.de/dechema_media/Downloads/Positionspapiere/Statuspap_Phosphat_2017_FINAL_NOV-p-20003290.pdf.

Blaabjerg, K.; Carlsson, N. G.; Hansen-Møller, J.; Poulsen, H. D. (2010a): Effect of heat-treatment, phytase, xylanase and soaking time on inositol phosphate degradation *in vitro* in wheat, soybean meal and rapeseed cake. In: *Animal Feed Science and Technology* 162 (3-4), S. 123–134. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2010.09.005.

Blaabjerg, K.; Hansen-Møller, J.; Poulsen, H. D. (2010b): High-performance ion chromatography method for separation and quantification of inositol phosphates in diets and digesta. In: *Journal of Chromatography* 878 (3-4), S. 347–354. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.11.046.

Boguhn, J.; Baumgärtel, T.; Dieckmann, A.; Rodehutscord, M. (2009): Determination of titanium dioxide supplements in different matrices using two methods involving photometer and inductively coupled plasma optical emission spectrometer measurements. In: *Archives of Animal Nutrition* 63 (4), S. 337–342. DOI: 10.1080/17450390903052623.

Brownlie, W. J.; Sutton, M. A.; Reay, D. S.; Heal, K. V.; Hermann, L.; Kabbe, C.; Spears, B. M. (2021): Global actions for a sustainable phosphorus future. In: *Nature Food* 2 (2), S. 71–74. DOI: 10.1038/s43016-021-00232-w.

Bryksin, A. V.; Matsumura, I. (2010): Overlap extension PCR cloning: A simple and reliable way to create recombinant plasmids. In: *BioTechniques* 48 (6), S. 463–465. DOI: 10.2144/000113418.

Castillo-Villamizar, G. A.; Nacke, H.; Griese, L.; Tabernero, L.; Funkner, K.; Daniel, R. (2019): Characteristics of the first Protein Tyrosine Phosphatase with phytase activity from a soil metagenome. In: *Genes* 10 (2). DOI: 10.3390/genes10020101.

Chen, C.; Cheng, K.; Ko, T.; Guo, R. (2015): Current progresses in phytase research. Three-dimensional structure and protein engineering. In: *ChemBioEng Reviews* 2 (2), S. 76–86. DOI: 10.1002/cben.201400026.

Cheng, Z. J.; Hardy, R. W. (2002): Effect of microbial phytase on apparent nutrient digestibility of barley, canola meal, wheat and wheat middlings, measured *in vivo* using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). In: *Aquaculture Nutrition* 8 (4), S. 271–277. DOI: 10.1046/j.1365-2095.2002.00219.x.

Christensen, T.; Dersjant-Li, Y.; Sewalt, V.; Mejldal, R.; Haaning, S.; Pricelius, S. et al. (2020): *In vitro* characterization of a novel consensus bacterial 6-phytase and one of its variants. In: *Life Sciences Education* 6 (3), S. 156–171. DOI: 10.2174/2212711906999201020201710.

Chu, H.; Guo, R.; Lin, T.; Chou, C.; Shr, H.; Lai, H. et al. (2004): Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate. DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. In: *Structure (London, England: 1993)* 12 (11), S. 2015–2024. DOI: 10.1016/j.str.2004.08.010.

Classen, H. L.; Apajalahti, J.; Svihus, B.; Choct, M. (2016): The role of the crop in poultry production. In: *World's Poultry Science Journal* 72 (3), S. 459–472. DOI: 10.1017/S004393391600026X.

Cordell, D.; Drangert, J.; White, S. (2009): The story of phosphorus. Global food security and food for thought. In: *Global Environmental Change* 19 (2), S. 292–305. DOI: 10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009.

Cordell, D.; White, S. (2014): Life's bottleneck: Sustaining the world's phosphorus for a food secure future. In: *Annual Review of Environment and Resources* 39 (1), S. 161–188. DOI: 10.1146/annurev-environ-010213-113300.

Cowieson, A. J. (2010): Strategic selection of exogenous enzymes for corn/soy-based poultry diets. In: *Journal of Poultry Science* 47 (1), S. 1–7. DOI: 10.2141/jpsa.009045.

David, L. S.; Abdollahi, M. R.; Bedford, M. R.; Ravindran, V. (2021): True ileal calcium digestibility in soybean meal and canola meal, and true ileal phosphorous digestibility in maize-soybean meal and maize-canola meal diets, without and with microbial phytase, for broiler growers and finishers. In: *British Poultry Science* 62 (2), S. 293–303. DOI: 10.1080/00071668.2020.1849559.

Denstadli, V.; Vestre, R.; Svihus, B.; Skrede, A.; Storebakken, T. (2006): Phytate degradation in a mixture of ground wheat and ground defatted soybeans during feed processing. Effects of temperature, moisture level, and retention time in small- and medium-scale incubation systems. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (16), S. 5887–5893. DOI: 10.1021/jf0605906.

Denu, J. M.; Dixon, J. E. (1998): Protein Tyrosine Phosphatases. Mechanisms of catalysis and regulation. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 2 (5), S. 633–641. DOI: 10.1016/S1367-5931(98)80095-1.

Dersjant-Li, Y.; Awati, A.; Schulze, H.; Partridge, G. (2015): Phytase in non-ruminant animal nutrition. A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95 (5), S. 878–896. DOI: 10.1002/jsfa.6998.

Dersjant-Li, Y.; Christensen, T.; Knudsen, S.; Bello, A.; Toghyani, M.; Liu, S. Y. et al. (2022): Effect of increasing dose level of a novel consensus bacterial 6-phytase variant on phytate degradation in broilers fed diets containing varied phytate levels. In: *British Poultry Science*, S. 1–11. DOI: 10.1080/00071668.2021.2000586.

Dersjant-Li, Y.; van de Belt, K.; Kwakernaak, C.; Marchal, L. (2020): *Buttiauxella* phytase maintains growth performance in broilers fed diets with reduced nutrients under a commercial setting. In: *Journal of Applied Animal Nutrition* 8 (2), S. 49–59. DOI: 10.3920/JAAN2020.0002.

Dionisio, G.; Holm, P. B.; Brinch-Pedersen, H. (2007): Wheat (Triticum aestivum L.) and barley (Hordeum vulgare L.) multiple inositol polyphosphate phosphatases (MINPPs) are phytases expressed during grain filling and germination. In: *Plant Biotechnology Journal* 5 (2), S. 325–338. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2007.00244.x.

Eeckhout, W.; de Paepe, M. (1994): Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. In: *Animal Feed Science and Technology* 47 (1-2), S. 19–29. DOI: 10.1016/0377-8401(94)90156-2.

Engler, C.; Gruetzner, R.; Kandzia, R.; Marillonnet, S. (2009): Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. In: *PloS one* 4 (5), e5553. DOI: 10.1371/journal.pone.0005553.

Engler, C.; Marillonnet, S. (2013): Combinatorial DNA assembly using Golden Gate cloning. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1073, S. 141–156. DOI: 10.1007/978-1-62703-625-2_12.

Fakhravar, A.; Hesampour, A. (2018): Rational design-based engineering of a thermostable phytase by site-directed mutagenesis. In: *Molecular Biology Reports* 45 (6), S. 2053–2061. DOI: 10.1007/s11033-018-4362-x.

Filippelli, G. M. (2011): Phosphate rock formation and marine phosphorus geochemistry: The deep time perspective. In: *Chemosphere* 84 (6), S. 759–766. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.019.

Fretzdorff, B.; Weipert, D. (1986): Phytinsäure in Getreide und Getreideerzeugnissen. Mitteilung I: Phytinsäure und Phytase in Roggen und Roggenprodukten. In: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 182 (4), S. 287–293. DOI: 10.1007/BF01027626.

Gilbert, N. (2009): Environment. The disappearing nutrient. In: *Nature* 461 (7265), S. 716–718. DOI: 10.1038/461716a.

Golovan, S. P.; Meidinger, R. G.; Ajakaiye, A.; Cottrill, M.; Wiederkehr, M. Z.; Barney, D. J. et al. (2001): Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. In: *Nature Biotechnology* 19 (8), S. 741–745. DOI: 10.1038/90788.

Greiling, A. M.; Tschesche, C.; Baardsen, G.; Kröckel, S.; Koppe, W.; Rodehutscord, M. (2019): Effects of phosphate and phytase supplementation on phytate degradation in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss W.) and atlantic salmon (Salmo salar L.). In: *Aquaculture* 503, S. 467–474. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.01.035.

Greiner, R.; Alminger, M. L. (2001): Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of cereals. In: *Journal of Food Biochemistry* 25 (3), S. 229–248. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2001.tb00736.x.

Greiner, R.; Konietzny, U.; Jany, K. D. (1993): Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303 (1), S. 107–113. DOI: 10.1006/abbi.1993.1261.

Greiner, R. (2021): Limitations of an *in vitro* model of the poultry digestive tract on the evaluation of the catalytic performance of phytases. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 101 (6), S. 2519–2524. DOI: 10.1002/jsfa.10878.

Greiner, R.; da Silva, L. G.; Couri, S. (2009): Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. In: *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (4), S. 795–807. DOI: 10.1590/s1517-838220090004000010.

Greiner, R.; Farouk, A. E.; Carlsson, N. G.; Konietzny, U. (2007a): *Myo*-inositol phosphate isomers generated by the action of a phytase from a malaysian waste-water bacterium. In: *The Protein Journal* 26 (8), S. 577–584. DOI: 10.1007/s10930-007-9100-5.

Greiner, R.; Konietzny, U.; Jany, K. D. (1998): Purification and properties of a phytase from rye. In: *Journal of Food Biochemistry* 22 (2), S. 143–161. DOI: 10.1111/j.1745-4514.1998.tb00236.x.

Greiner, R.; Lim, B. L.; Cheng, C.; Carlsson, N. G. (2007b): Pathway of phytate dephosphorylation by beta-propeller phytases of different origins. In: *Canadian Journal of Microbiology* 53 (4), S. 488–495. DOI: 10.1139/W07-015.

Greiner und Konietzny (2010): Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. In: Enzymes in farm animal nutrition. Wallingford: CABI, S. 96–128.

Ha, N. C.; Oh, B. C.; Shin, S.; Kim, H. J.; Oh, T. K.; Kim, Y. O. et al. (2000): Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. In: *Nature Structural Biology* 7 (2), S. 147–153. DOI: 10.1038/72421.

Hegeman, C. E.; Grabau, E. A. (2001): A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. In: *Plant Physiology* 126 (4), S. 1598–1608. DOI: 10.1104/pp.126.4.1598.

Herrmann, K. R.; Hofmann, I.; Jungherz, D.; Wittwer, M.; Infanzón, B.; Hamer, S. N. et al. (2021): Generation of phytase chimeras with low sequence identities and improved thermal stability. In: *Journal of Biotechnology* 339, S. 14–21. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2021.07.005.

Hou, X.; Shen, Z.; Li, N.; Kong, X.; Sheng, K.; Wang, J.; Wang, Y. (2020): A novel fungal beta-propeller phytase from nematophagous *Arthrobotrys oligospora*: Characterization and potential application in phosphorus and mineral release for feed processing. In: *Microbial Cell Factories* 19 (1), S. 84. DOI: 10.1186/s12934-020-01346-9.

Huang, H.; Luo, H.; Wang, Y.; Fu, D.; Shao, N.; Wang, G. et al. (2008): A novel phytase from *Yersinia rohdei* with high phytate hydrolysis activity under low pH and strong pepsin conditions. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (3), S. 417–426. DOI: 10.1007/s00253-008-1556-5.

Huang, H.; Zhang, R.; Fu, D.; Luo, J.; Li, Z.; Luo, H. et al. (2011): Diversity, abundance and characterization of ruminal cysteine phytases suggest their important role in phytate degradation. In: *Environmental Microbiology* 13 (3), S. 747–757. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02379.x.

Humer, E.; Schwarz, C.; Schedle, K. (2015): Phytate in pig and poultry nutrition. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99 (4), S. 605–625. DOI: 10.1111/jpn.12258.

Hussain, S. M.; Hanif, S.; Sharif, A.; Bashir, F.; Iqbal, H. M. (2021): Unrevealing the sources and catalytic functions of phytase with multipurpose characteristics. In: *Catalysis Lett*ers. DOI: 10.1007/s10562-021-03752-z.

Ingelmann, C. J; Witzig, M.; Möhring, J.; Schollenberger, M.; Kühn, I.; Rodehutscord, M. (2019): Phytate degradation and phosphorus digestibility in broilers and turkeys fed different corn sources with or without added phytase. In: *Poultry Science* 98 (2), S. 912–922. DOI: 10.3382/ps/pey438.

Jongbloed, A. W.; Mroz, Z.; Kemme, P. A. (1992): The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections of the alimentary tract. In: *Journal of Animal Science* 70 (4), S. 1159–1168. DOI: 10.2527/1992.7041159x.

Karimi, A.; Min, Y.; Lu, C.; Coto, C.; Bedford, M. R.; Waldroup, P. W. (2013): Assessment of potential enhancing effects of a carbohydrase mixture on phytase efficacy in male broiler chicks fed phosphorus-deficient diets from 1 to 18 days of age. In: *Poultry Science* 92 (1), S. 192–198. DOI: 10.3382/ps.2012-02558.

Kempapidis, T.; Bradshaw, N. J.; Hodges, H. E.; Cowieson, A. J.; Cameron, D. D.; Falconer, R. J. (2020): Phytase catalysis of dephosphorylation studied using isothermal titration calorimetry and electrospray ionization time-of-flight mass spectroscopy. In: *Analytical Biochemistry* 606, S. 113859. DOI: 10.1016/j.ab.2020.113859.

Kerr, M. J.; Classen, H. L.; Newkirk, R. W. (2000): The effects of gastrointestinal tract micro-flora and dietary phytase on inositol hexaphosphate hydrolysis in the chicken. In: Poultry Science 79 (Suppl. 1), 11 (abstract).

Kim, H. W.; Kim, Y. O.; Lee, J. H.; Kim, K. K.; Kim, Y. J. (2003): Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. In: *Biotechnology Letters* 25 (15), S. 1231–1234. DOI: 10.1023/A:1025020309596.

Kim, M. S.; Lei, X. G. (2008): Enhancing thermostability of *Escherichia coli* phytase AppA2 by error-prone PCR. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (1), S. 69–75. DOI: 10.1007/s00253-008-1412-7.

Kirchgeßner, M.; Stangl, G. I.; Schwarz, F. J.; Roth, F. X. (2014): Tierernährung. Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis. 14., aktualisierte Auflage Frankfurt am Main: DLG-Verlag.

Kisinyo, P. O.; Opala, P. A. (2020): Depletion of phosphate rock reserves and world food crisis. Reality or hoax? In: *African Journal of Agricultural Research* 16 (9), S. 1223–1227. DOI: 10.5897/AJAR2020.14892.

Konietzny, U.; Greiner, R. (2002): Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). In: *International Journal of Food Science and Technology* 37 (7), S. 791–812. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2002.00617.x.

Kostrewa, D.; Wyss, M.; D'Arcy, A.; van Loon, A. P. (1999): Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2. 4 A resolution. In: *Journal of Molecular Biology* 288 (5), S. 965–974. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2736.

Krieg, J.; Borda-Molina, D.; Siegert, W.; Sommerfeld, V.; Chi, Y. P.; Taheri, H. R. et al. (2021): Effects of calcium level and source, formic acid, and phytase on phytate degradation and the microbiota in the digestive tract of broiler chickens. In: *Animal Microbiome* 3 (1), S. 23. DOI: 10.1186/s42523-021-00083-7.

Kristoffersen, S.; Itani, K.; Benzertiha, A.; Kierończyk, B.; Kjos, N. P.; Svihus, B. (2021): Effect of crop retention time and acidification of the feed on phytase efficacy in broiler chickens. In: *British Poultry Science* 62 (3), S. 443–451. DOI: 10.1080/00071668.2020.1870661.

Kumar, V.; Sinha, A. K.; Makkar, H. P. S.; Boeck, G. de; Becker, K. (2012): Phytate and phytase in fish nutrition. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96 (3), S. 335–364. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x.

Kumar, V.; Yadav, A. N.; Verma, P.; Sangwan, P.; Saxena, A.; Kumar, K.; Singh, B. (2017): β-Propeller phytases. Diversity, catalytic attributes, current developments and potential biotechnological applications. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 98, S. 595–609. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.134.

Lassen, S. F.; Breinholt, J.; Østergaard, 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*, *Ceriporia sp.*, and *Trametes pubescens*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10), S. 4701–4707. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4701-4707.2001.

Lawlor, P. G.; Lynch, P. B.; Caffrey, P. J.; O'Reilly, J. J.; O'Connell, M. K. (2005): Measurements of the acid-binding capacity of ingredients used in pig diets. In: *Irish Veterinary Journal* 58 (8), S. 447–452. DOI: 10.1186/2046-0481-58-8-447.

Lei, X. G.; Porres, J. M. (2007): Phytase and inositol phosphates in animal nutrition. Dietary manipulation and phosphorus excretion by animals. In: Inositol phosphates. Linking agriculture and the environment. Wallingford: CABI, S. 133–149.

Lemos, D.; Tacon, A. G. (2017): Use of phytases in fish and shrimp feeds: A review. In: *Reviews in Aquaculture* 9 (3), S. 266–282. DOI: 10.1111/raq.12138.

Leske, K. L.; Coon, C. N. (1999): A bioassay to determine the effect of phytase on phytate phosphorus hydrolysis and total phosphorus retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. In: *Poultry Science* 78 (8), S. 1151–1157. DOI: 10.1093/ps/78.8.1151.

Lim, D.; Golovan, S.; Forsberg, C. W.; Jia, Z. (2000): Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. In: *Nature Structural Biology* 7 (2), S. 108–113. DOI: 10.1038/72371.

Liu, P.; Cai, Z.; Chen, Z.; Mo, X.; Ding, X.; Liang, C. et al. (2018): A root-associated purple acid phosphatase, SgPAP23, mediates extracellular phytate-P utilization in *Stylosanthes guianensis*. In: *Plant, Cell and Environment* 41 (12), S. 2821–2834. DOI: 10.1111/pce.13412.

Lott, J. N.; Ockenden, I.; Raboy, V.; Batten, G. D. (2000): Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: A global estimate. In: *Seed Science Research* 10 (1), S. 11–33. DOI: 10.1017/S0960258500000039.

Lu, F.; Guo, G.; Li, Q.; Feng, D.; Liu, Y.; Huang, H. et al. (2014): Preparation, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of dual-domain β-propeller phytase from *Bacillus sp. HJB17*. In: *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications* 70 (Pt 12), S. 1671–1674. DOI: 10.1107/S2053230X14024388.

Maenz, D. D.; Engele-Schaan, C. M.; Newkirk, R. W.; Classen, H. L. (1999): The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. In: *Animal Feed Science and Technology* 81 (3-4), S. 177–192. DOI: 10.1016/S0377-8401(99)00085-1.

Manangi, M.; Coon, C. N. (2007): The effect of calcium carbonate particle size and solubility on the utilization of phosphorus from phytase for broilers. In: *International Journal of Poultry Science*. Online verfügbar unter: https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012051915.

Marienhagen, J.; Dennig, A.; Schwaneberg, U. (2012): Phosphorothioate-based DNA recombination: An enzyme-free method for the combinatorial assembly of multiple DNA fragments. In: *BioTechniques* 52 (5). DOI: 10.2144/000113865.

Mehta, B. D.; Jog, S. P.; Johnson, S. C.; Murthy, P. N. (2006): Lily pollen alkaline phytase is a histidine phosphatase similar to mammalian multiple inositol polyphosphate phosphatase (MINPP). In: *Phytochemistry* 67 (17), S. 1874–1886. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.06.008.

Menezes-Blackburn, D.; Greiner, R.; Konietzny, U. (2022): Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics qrelevant to animal feed use. In: Enzymes in Farm Animal Nutrition, M. R. Bedford, G. Partridge, C. L. Walk, M. Hruby, C. Evans, H. Irving et al. (Hg.), Bd. 82. GB: CABI, 3. Auflage, S. 103–123.

Mier-Guerra, J. R.; Herrera-Valencia, V. A.; Góngora-Castillo, E.; Peraza-Echeverria, S. (2021): Discovery of potential phytases of the purple acid phosphatase family in a wide range of photosynthetic organisms and insights into their structure and evolution. In: *Gene Reports* 25, S. 101398. DOI: 10.1016/j.genrep.2021.101398.

Morales, G. A.; Marquez, L.; Hernández, A. J.; Moyano, F. J. (2016): Phytase effects on protein and phosphorus bioavailability in fish diets. In: Phytate destruction - consequences for precision animal nutrition: Wageningen Academic Publishers, S. 129–165.

Mullaney, E. J.; Daly, C. B.; Ullah, A. H. (2000): Advances in phytase research. In: *Advances in Applied Microbiology* 47, S. 157–199. DOI: 10.1016/s0065-2164(00)47004-8.

Mullaney, E. J.; Ullah, A. H. (1998): Conservation of the active site motif in *Aspergillus niger* (*ficuum*) pH 6.0 optimum acid phosphatase and kidney bean purple acid phosphatase. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243 (2), S. 471–473. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8116.

Mullaney and Ullah (2007): Phytases. Attributes, catalytic mechanisms and applications. In: Inositol phosphates. Linking agriculture and the environment. Wallingford: CABI, S. 97–110.

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. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64 (5), S. 995–1003. DOI: 10.1271/bbb.64.995.

Nakano, T.; Joh, T.; Tokumoto, E.; Hayakawa, T. (1999): Purification and characterization of phytase from bran of Triticum aestivum L. cv. Nourin #61. In: *Food Science and Technology Research* 5 (1), S. 18–23. DOI: 10.3136/fstr.5.18.

Nakashima, B. A.; McAllister, T. A.; Sharma, R.; Selinger, L. B. (2007): Diversity of phytases in the rumen. In: *Microbial Ecology* 53 (1), S. 82–88. DOI: 10.1007/s00248-006-9147-4.

Newkirk, R. W.; Classen, H. L. (1998): *In vitro* hydrolysis of phytate in canola meal with purified and crude sources of phytase. In: *Animal Feed Science and Technology* 72 (3-4), S. 315–327. DOI: 10.1016/S0377-8401(97)00190-9.

Niu, C.; Yang, P.; Luo, H.; Huang, H.; Wang, Y.; Yao, B. (2017): Engineering the residual side chains of HAP phytases to improve their pepsin resistance and catalytic efficiency. In: *Scientific Reports* 7, S. 42133. DOI: 10.1038/srep42133.

O´Dell, B. L.; Boland, A. R. de; Koirtyohann, S. R. (1972): Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (20), S. 718–721.

Oh, B. C.; Chang, B. S.; Park, K. H.; Ha, N. C.; Kim, H. K.; Oh, B. H.; Oh, T. K. (2001): Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens DS11*. In: *Biochemistry* 40 (32), S. 9669–9676. DOI: 10.1021/bi010589u.

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. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (4), S. 362–372. DOI: 10.1007/s00253-003-1345-0.

Olfs (2019): Phosphordüngung nach Bodenuntersuchung: Modifizierte Richtwerte für die P-Gehaltsklassen im Boden. In: Dachverband Agrarforschung e.V. (Hg.): Phosphoreinsatz in der Landwirtschaft zwischen Knappheit und Überschuss. Wissenschaftliche Tagung des Dachverbandes

Agrarforschung (DAF) e.V. Eschborner Landstraße 122, 60489 Frankfurt am Main: DLG-Verlag (52), S. 14–28.

Olukosi, O. A.; Cowieson, A. J.; Adeola, O. (2010): Broiler responses to supplementation of phytase and admixture of carbohydrases and protease in maize-soyabean meal diets with or without maize distillers' dried grain with solubles. In: *British Poultry Science* 51 (3), S. 434–443. DOI: 10.1080/00071668.2010.493170.

Olukosi, O. A.; González-Ortiz, G.; Whitfield, H.; Bedford, M. R. (2020): Comparative aspects of phytase and xylanase effects on performance, mineral digestibility, and ileal phytate degradation in broilers and turkeys. In: *Poultry Science* 99 (3), S. 1528–1539. DOI: 10.1016/j.psj.2019.11.018.

Ostanin, K.; Harms, E. H.; Stevis, P. E.; Kuciel, R.; Zhou, M. M.; van Etten, R. L. (1992): Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. In: *Journal of Biological Chemistry* 267 (32), S. 22830–22836. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)50022-3.

Outchkourov, N.; Petkov, S. (2019): Phytases for feed applications. In: Andreas Vogel und Oliver May (Hg.): Industrial Enzyme Applications. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, S. 255–285.

Pagano, A. R.; Roneker, K. R.; Lei, X. G. (2007): Distribution of supplemental *Escherichia coli* AppA2 phytase activity in digesta of various gastrointestinal segments of young pigs. In: *Journal of Animal Science* 85 (6), S. 1444–1452. DOI: 10.2527/jas.2006-111.

Paloheimo, M.; Piironen, J.; Vehmaanpera, J. (2010): Xylanases and cellulases as feed additives. In: Enzymes in Farm Animal Nutrition. Wallingford: CABI, S. 12–53.

Papp, M.; Sommerfeld, V.; Schollenberger, M.; Avenhaus, U.; Rodehutscord, M. (2022): Phytate degradation and phosphorus utilisation by broiler chickens fed diets containing wheat with increased phytase activity. In: *British Poultry Science*, S. 1–11. DOI: 10.1080/00071668.2021.1966756.

Peraza-Echeverria, S.; Bernardo-Candelero, S.; Baas-Espinola, F. M.; Puch-Hau, C.; Rivera-Solís, R. A.; Echevarría-Machado, I. et al. (2021): Production of a ruminal bacterial phytase in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* with potential applications in monogastric animal feed. In: *Bioresource Technology Reports* 14, S. 100660. DOI: 10.1016/j.biteb.2021.100660.

Plumstead, P. W.; Leytem, A. B.; Maguire, R. O.; Spears, J. W.; Kwanyuen, P.; Brake, J. (2008): Interaction of calcium and phytate in broiler diets. 1. Effects on apparent prececal digestibility and retention of phosphorus. In: *Poultry Science* 87 (3), S. 449–458. DOI: 10.3382/ps.2007-00231.

Pontoppidan, K.; Glitsoe, V.; Guggenbuhl, P.; Quintana, A. P.; Nunes, C. S.; Pettersson, D.; Sandberg, A. S. (2012): *In vitro* and *in vivo* degradation of *myo*-inositol hexakisphosphate by a phytase from *Citrobacter braakii*. In: *Archives of Animal Nutrition* 66 (6), S. 431–444. DOI: 10.1080/1745039X.2012.735082.

Prattley, C. A.; Stanley, D. W. (1982): Protein-phytate interactions in soybeans. Localisation of phytate in protein bodies and globoids. In: *Journal of Food Biochemistry* 6 (4), S. 243–254. DOI: 10.1111/j.1745-4514.1982.tb00305.x.

Puhl, A. A.; Greiner, R.; Selinger, L. B. (2008): A protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* has specificity for the 5-phosphate of *myo*-inositol hexakisphosphate. In: *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40 (10), S. 2053–2064. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.02.003.

Puhl, A. A.; Greiner, R.; Selinger, L. B. (2009): Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis by a protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Megasphaera elsdenii*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 82 (1), S. 95–103. DOI: 10.1007/s00253-008-1734-5.

Qi, W.; Su, R. X.; He, Z. M.; Zhang, Y. B.; Jin, F. M. (2007): Pepsin-induced changes in the size and molecular weight distribution of bovine casein during enzymatic hydrolysis. In: *Journal of Dairy Science* 90 (11), S. 5004–5011. DOI: 10.3168/jds.2007-0230.

Quan, C. S.; Fan, S. D; Zhang, L. H.; Wang, Y. J.; Ohta, Y. (2002): Purification and properties of a phytase from *Candida krusei WZ-001*. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94 (5), S. 419–425. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80219-5.

Raboy, V. (2001): Seeds for a better future. ‘Low phytate’ grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. In: *Trends in Plant Science* 6 (10), S. 458–462. DOI: 10.1016/S1360-1385(01)02104-5.

Raboy, V. (2007): Seed Phosphorus and the development of low-phytate crops. In: Inositol phosphates. Linking agriculture and the environment. Wallingford: CABI, S. 111–132.

Ravindran, V. (2013): Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. In: *Journal of Applied Poultry Research* 22 (3), S. 628–636. DOI: 10.3382/japr.2013-00739.

Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Finn, R. (2016): Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. In: *Nucleic Acids Research* 44 (D1), D343-50. DOI: 10.1093/nar/gkv1118.

Rigden, D. (2008): The histidine phosphatase superfamily: Structure and function. In: *The Biochemical Journal* 409 (2), S. 333–348. DOI: 10.1042/BJ20071097.

Rodehutscord, M.; Rosenfelder, P. (2016): Update on phytate degradation pattern in the gastrointestinal tract of pigs and broiler chickens. In: Phytate destruction - consequences for precision animal nutrition, C. L. Walk, I. Kühn, H. H. Stein, M. T. Kidd und M. Rodehutscord (Hg.): Wageningen Academic Publishers, S. 15–32.

Rodehutscord, M.; Sommerfeld, V.; Kühn, I.; Bedford, M. R. (2022): Phytases. Potential and limits of phytate destruction in the digestive tract of pigs and poultry. In: Enzymes in Farm Animal Nutrition. M. R. Bedford, G. Partridge, C. L. Walk, M. Hruby, C. Evans, H. Irving et al. (Hg.), GB: CABI, 3. Auflage, S. 124–152.

Rodehutscord, M.; Rückert, C.; Maurer, H. P.; Schenkel, H.; Schipprack, W.; Bach K., Knud E. et al. (2016): Variation in chemical composition and physical characteristics of cereal grains from different genotypes. In: *Archives of Animal Nutrition* 70 (2), S. 87–107. DOI: 10.1080/1745039X.2015.1133111.

Rombola, T. H.; Pedrinho, E. A.; Macedo L., de Eliana G.; Gonçalves, A. M.; dos Santos, L. F.; Pizauro, J. M. (2014): Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. In: *BMC Research Notes* 7, S. 221. DOI: 10.1186/1756-0500-7-221.

Rumsey, G. L. (1993): Fish meal and alternate sources of protein in fish feeds update 1993. In: *Fisheries* 18 (7), S. 14–19. DOI: 10.1577/1548-8446(1993)018<0014:FMAASO>2.0.CO;2.

Sanchez-Romero, I.; Ariza, A.; Wilson, K. S.; Skjøt, M.; Vind, J.; de Maria, L. et al. (2013): Mechanism of protein kinetic stabilization by engineered disulfide crosslinks. In: *PloS one* 8 (7), e70013. DOI: 10.1371/journal.pone.0070013.

Schenk, G.; Mitić, N.; Hanson, G. R.; Comba, P. (2013): Purple acid phosphatase. A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. In: *Coordination Chemistry Reviews* 257 (2), S. 473–482. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.03.020.

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. In: *Archiv für Tierernährung* 55 (4), S. 255–280. DOI: 10.1080/17450390109386197.

Schneider, K. D.; Thiessen M., J.; Zvomuya, F.; Reid, D. K.; Fraser, T. D.; Lynch, D. H. et al. (2019): Options for improved phosphorus cycling and use in agriculture at the field and regional scales. In: *Journal of Environmental Quality* 48 (5), S. 1247–1264. DOI: 10.2134/jeq2019.02.0070.

Scholey, D.; Burton, E.; Morgan, N.; Sanni, C.; Madsen, C. K.; Dionisio, G.; Brinch-Pedersen, H. (2017): P and Ca digestibility is increased in broiler diets supplemented with the high-phytase HIGHPHY wheat. In: *Animal: An International Journal of Animal Bioscience* 11 (9), S. 1457–1463. DOI: 10.1017/S1751731117000544.

Sebastian, S.; Touchburn, S. P.; Chavez, E. R (1998): Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: A review. In: *World's Poultry Science Journal* 54 (1), S. 27–47. DOI: 10.1079/WPS19980003.

Secco, D.; Bouain, N.; Rouached, A.; Prom-U-Thai, C.; Hanin, M.; Pandey, A. K.; Rouached, H. (2017): Phosphate, phytate and phytases in plants: From fundamental knowledge gained in

Arabidopsis to potential biotechnological applications in wheat. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 37 (7), S. 898–910. DOI: 10.1080/07388551.2016.1268089.

Selle, P. H.; Ravindran, V.; Caldwell, A.; Bryden, W. L. (2000): Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. In: *Nutrition Research Reviews* 13 (2), S. 255–278. DOI: 10.1079/095442200108729098.

Selle, P. H.; Cowieson, A. J.; Ravindran, V. (2009): Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. In: *Livestock Science* 124 (1-3), S. 126–141. DOI: 10.1016/j.livsci.2009.01.006.

Selle, P. H.; Ravindran, V. (2007): Microbial phytase in poultry nutrition. In: *Animal Feed Science and Technology* 135 (1-2), S. 1–41. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010.

Sharma, R.; Kumar, P.; Kaushal, V.; Das, R.; Kumar Navani, N. (2018): A novel protein tyrosine phosphatase like phytase from *Lactobacillus fermentum NKN51*: Cloning, characterization and application in mineral release for food technology applications. In: *Bioresource Technology* 249, S. 1000–1008. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.10.106.

Sharpley, A.; Jarvie, H.; Flaten, D.; Kleinman, P. (2018): Celebrating the 350th Anniversary of phosphorus discovery: A conundrum of deficiency and excess. In: *Journal of Environmental Quality* 47 (4), S. 774–777. DOI: 10.2134/jeq2018.05.0170.

Sharpley, A.; Kleinman, P. J.; McDowell, R. W.; Gitau, M.; Bryant, R. B. (2002): Modeling phosphorus transport in agricultural watersheds: Processes and possibilities. In: *Journal of Soil and Water Conservation* 57 (6), S. 425–439. Online verfügbar unter: https://www.jswconline.org/content/57/6/425.

Shastak, Y.; Zeller, E.; Witzig, M.; Schollenberger, M.; Rodehutscord, M. (2014): Effects of the composition of the basal diet on the evaluation of mineral phosphorus sources and interactions with phytate hydrolysis in broilers. In: *Poultry Science* 93 (10), S. 2548–2559. DOI: 10.3382/ps.2014-03961.

Shears and Turner (2007): Nomenclature and terminology of inositol phosphates. Clarification and a glossary of terms. In: Inositol Phosphates. Linking agriculture and the environment. Wallingford: CABI, S. 1–6.

Shin, S.; Ha, N. C.; Oh, B. C.; Oh, T. K.; Oh, B. H. (2001): Enzyme mechanism and catalytic property of β-Propeller-Phytase. In: *Structure (London, England: 1993)* 9 (9), S. 851–858. DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00637-2.

Siegert, W.; Zuber, T.; Sommerfeld, V.; Krieg, J.; Feuerstein, D.; Kurrle, U.; Rodehutscord, M. (2019): Prececal amino acid digestibility and phytate degradation in broiler chickens when using

different oilseed meals, phytase and protease supplements in the feed. In: *Poultry Science* 98 (11), S. 5700–5713. DOI: 10.3382/ps/pez355.

Siegert, W.; Krieg, J.; Sommerfeld, V.; Borda-Molina, D.; Feuerstein, D.; Camarinha-Silva, A.; Rodehutscord, M. (2021): Phytase supplementation effects on amino acid digestibility in broiler chickens are influenced by dietary calcium concentrations but not by acid-binding capacity. In: *Current Developments in Nutrition* 5 (8), nzab103. DOI: 10.10937/cdn/nzab103.

Simon, O.; Igbasan, F. (2002): *In vitro* properties of phytases from various microbial origins. In: *International Journal of Food Science and Technology* 37 (7), S. 813–822. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2002.00621.x.

Sommerfeld, V.; Schollenberger, M.; Kühn, I.; Rodehutscord, M. (2018): Interactive effects of phosphorus, calcium, and phytase supplements on products of phytate degradation in the digestive tract of broiler chickens. In: *Poultry Science* 97 (4), S. 1177–1188. DOI: 10.3382/ps/pex404.

Sommerfeld, V.; Schollenberger, M.; Hemberle, L.; Rodehutscord, M. (2017): Modification and application of an *in vitro* assay to examine inositol phosphate degradation in the digestive tract of poultry. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (12), S. 4219–4226. DOI: 10.1002/jsfa.8297.

Sommerfeld, V.; van Kessel, A. G.; Classen, H. L.; Schollenberger, M.; Kühn, I.; Rodehutscord, M. (2019): Phytate degradation in gnotobiotic broiler chickens and effects of dietary supplements of phosphorus, calcium, and phytase. In: *Poultry Science* 98 (11), S. 5562–5570. DOI: 10.3382/ps/pez309.

Steiner, T.; Mosenthin, R.; Zimmermann, B.; Greiner, R.; Roth, S. (2007): Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. In: *Animal Feed Science and Technology* 133 (3-4), S. 320–334. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.04.007.

Suzuki, U.; Yoshimura, K.; Takaishi, M. (1907): Ueber ein Enzym "Phytase" das "Anhydro-oxy-methylen diphosphorsaure" spaltet. In: *Tokyo Imperial University College of Agriculture Bulletin* (7), S. 503–512. Online verfügbar unter https://core.ac.uk/reader/14509490.

Svihus, B.; Sacranie, A.; Denstadli, V.; Choct, M. (2010): Nutrient utilization and functionality of the anterior digestive tract caused by intermittent feeding and inclusion of whole wheat in diets for broiler chickens. In: *Poultry Science* 89 (12), S. 2617–2625. DOI: 10.3382/ps.2010-00743.

Tamim, N. M.; Angel, R.; Christman, M. (2004): Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. In: *Poultry Science* 83 (8), S. 1358–1367. DOI: 10.1093/ps/83.8.1358.

Tamim, N. M.; Angel, R. (2003): Phytate phosphorus hydrolysis as influenced by dietary calcium and micro-mineral source in broiler diets. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (16), S. 4687–4693. DOI: 10.1021/jf034122x.

Turner, B. L.; Richardson, A. E.; Mullaney, E. J. (Hg.) (2007): Inositol phosphates. Linking agriculture and the environment. Wallingford: CABI, S. V-1.

U.S. Geological Survey (2022): Mineral commodity summaries 2022. Hg. v. U.S. Geological Survey. National Minerals Information Center. Reston, VA (Mineral Commodity Summaries). Online verfügbar unter: http://pubs.er.usgs.gov/publication/mcs2022.

UBA (2015): Umweltbelastende Stoffeinträge aus der Landwirtschaft. Möglichkeiten und Maßnahmen zu ihrer Minderung in der konventionellen Landwirtschaft und im ökologischen Landbau. Umweltbundesamt 2015 (Hg). Online verfügbar unter: https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/umweltbelastende_stoffeintraege_aus_der_landwirtschaft_1.pdf.

Ullah, A. H.; Phillippy, B. Q. (1994): Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using *myo*-inositol phosphates. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (2), S. 423–425. DOI: 10.1021/jf00038a034.

Urban, A.; Neukirchen, S.; Jaeger, K. E. (1997): A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. In: *Nucleic Acids Research* 25 (11), S. 2227–2228. DOI: 10.1093/nar/25.11.2227.

van Etten, R. L.; Davidson, R.; Stevis, P. E.; MacArthur, H.; Moore, D. L. (1991): Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (4), S. 2313–2319. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)52245-6.

van Vuuren, D. P.; Bouwman, A. F.; Beusen, A.H.W. (2010): Phosphorus demand for the 1970–2100 period. A scenario analysis of resource depletion. In: *Global Environmental Change* 20 (3), S. 428–439. DOI: 10.1016/j.gloenvcha.2010.04.004.

Vieira, M. S.; Pereira, V. V.; Da Cunha Morales Á., A.; Nogueira, L. M.; Lima, W. J.; Granjeiro, P. A. et al. (2019): Expression and biochemical characterization of a *Yersinia intermedia* phytase expressed in *Escherichia coli*. In: *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture* 10 (2), S. 131–139. DOI: 10.2174/2212798410666181205114153.

Vohra, P.; Gray, G. A.; Kratzer, F. H. (1965): Phytic acid-metal complexes. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 120 (2), S. 447–449. DOI: 10.3181/00379727-120-30559.

Walan, P.; Davidsson, S.; Johansson, S.; Höök, M. (2014): Phosphate rock production and depletion. Regional disaggregated modeling and global implications. In: *Resources, Conservation and Recycling* 93 (2), S. 178–187. DOI: 10.1016/j.resconrec.2014.10.011.

Weber, S.; Stirnimann, C. U.; Wieser, M.; Frey, D.; Meier, R.; Engelhardt, S. et al. (2014): A type IV translocated *Legionella* cysteine phytase counteracts intracellular growth restriction by phytate. In: *The Journal of Biological Chemistry* 289 (49), S. 34175–34188. DOI: 10.1074/jbc.M114.592568.

Wilcock, P.; Walk, C. L. (2016): Chapter 6 Low phytate nutrition – what is the pig and poultry industry doing to counter dietary phytate as an anti-nutrient and how is it being applied? In: Phytate destruction - consequences for precision animal nutrition. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, S. 87–106.

Wyss, M.; Brugger, R.; Kronenberger, A.; Rémy, R.; Fimbel, R.; Oesterhelt, G. et al. (1999): Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases). Catalytic properties. In: *Applied and Environmental Microbiology* 65 (2), S. 367–373. DOI: 10.1128/AEM.65.2.367-373.1999.

Wyss, M.; Pasamontes, L.; Rémy, R.; Kohler, J.; Kusznir, E.; Gadient, M. et al. (1998): Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* PH 2.5 acid phosphatase. In: *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11), S. 4446–4451. DOI: 10.1128/AEM.64.11.4446-4451.1998.

Xiao, K.; Harrison, M. J.; Wang, Z. Y. (2005): Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by Arabidopsis. In: *Planta* 222 (1), S. 27–36. DOI: 10.1007/s00425-005-1511-y.

Yan, J.; Yang, X.; Shah, T.; Sánchez-Villeda, H.; Li, J.; Warburton, M. et al. (2010): High-throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize. In: *Molecular Breeding* 25 (3), S. 441–451. DOI: 10.1007/s11032-009-9343-2.

Yanke, L. J.; Selinger, L. B.; Cheng, K. J. (2002): Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*. A preliminary characterization. In: *Letters in Applied Microbiology* 29 (1), S. 20–25. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00568.x.

Yu, B.; Jan, Y. C.; Chung, T. K.; Lee, T. T.; Chiou, P.W. (2004): Exogenous phytase activity in the gastrointestinal tract of broiler chickens. In: *Animal Feed Science and Technology* 117 (3-4), S. 295–303. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2004.08.011.

Yu, S.; Cowieson, A.; Gilbert, C.; Plumstead, P.; Dalsgaard, S. (2012): Interactions of phytate and *myo*-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin1. In: *Journal of Animal Science* 90 (6), S. 1824–1832. DOI: 10.2527/jas.2011-3866.

Yu, S.; Kvidtgaard, I.; Dalsgaard, S. (2014): Characterization of a mutant *Buttiauxella* phytase using phytic acid and phytic acid-protein complex as substrates. In: *Animal Science Letters* (Vol. 1), Artikel No. 1, S. 18–32. Online verfügbar unter: https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1045.9766&rep=rep1&type=pdf.

Zeller, E.; Schollenberger, M.; Kühn, I.; Rodehutscord, M. (2016): Dietary effects on inositol phosphate breakdown in the crop of broilers. In: *Archives of Animal Nutrition* 70 (1), S. 57–71. DOI: 10.1080/1745039X.2015.1112622.

Zeller, E.; Schollenberger, M.; Witzig, M.; Shastak, Y.; Kühn, I.; Hoelzle, L. E.; Rodehutscord, M. (2015): Interactions between supplemented mineral phosphorus and phytase on phytate hydrolysis and inositol phosphates in the small intestine of broilers. In: *Poultry Science* 94 (5), S. 1018–1029. DOI: 10.3382/ps/pev087.

Zeng, Y. F.; Ko, T. P.; Lai, H. L.; Cheng, Y. S.; Wu, T. H.; Ma, Y. (2011): Crystal structures of *Bacillus* alkaline phytase in complex with divalent metal ions and inositol hexasulfate. In: *Journal of Molecular Biology* 409 (2), S. 214–224. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.03.063.

Zhang, W.; Mullaney, E. J.; Lei, X. G. (2007): Adopting selected hydrogen bonding and ionic interactions from *Aspergillus fumigatus* phytase structure improves the thermostability of *Aspergillus niger* PhyA phytase. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (9), S. 3069–3076. DOI: 10.1128/AEM.02970-06.

Zinin, N. V.; Serkina, A. V.; Gelfand, M. S.; Shevelev, A. B.; Sineoky, S. P. (2004): Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. In: *FEMS Microbiology Letters* 236 (2), S. 283–290. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.05.051.

11 Anhang

Tabelle 35: Einfluss verschiedener Mineralstoffverbindungen auf die Phytaseaktivität bei unterschiedlichen pH-Werten dargestellt als Restaktivität in %.

	pH-Wert	Relative Phytaseaktivität (%) bei einer Mineralstoff-Konzentration von 0-2 mg/ml										
		0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000
Zinksulfat	3,0	100.0	99.5	97.2	97.9	97.9	96.1	95.7	92.0	91.6	82.1	67.2
	3,5	100.0	98.3	96.8	99.7	98.1	94.9	91.4	83.3	66.4	20.5	12.7
	4,0	100.0	96.8	93.8	90.5	85.9	76.9	66.2	48.6	13.3	12.0	12.9
	4,5	100.0	93.9	85.5	78.0	67.7	54.8	16.6	11.2	10.5	14.0	10.4
	5,0	100.0	87.5	79.4	67.2	55.1	39.4	9.5	10.1	10.6	10.9	3.7
	5,5	100.0	81.5	68.5	54.9	40.5	6.2	7.3	8.1	9.4	10.3	0.0
Calciumchlorid	3,0	100.0	97.7	96.1	97.6	97.8	97.6	99.4	100.9	107.0	114.1	123.5
	3,5	100.0	97.6	96.7	95.0	97.1	95.7	96.9	98.2	102.4	107.5	113.3
	4,0	100.0	98.7	96.2	95.2	95.3	94.4	94.1	96.2	99.0	103.7	109.7
	4,5	100.0	97.5	96.8	95.9	94.6	94.8	94.8	96.7	99.5	53.8	45.1
	5,0	100.0	97.5	96.9	96.7	96.3	97.9	99.0	98.7	42.5	38.2	42.8
	5,5	100.0	99.4	97.8	96.3	96.9	98.0	98.1	103.2	26.9	46.1	35.1
Mangansulfat	3,0	100.0	96.1	95.7	94.9	96.5	96.3	99.1	99.2	106.8	110.2	123.9
	3,5	100.0	99.6	98.9	98.9	101.4	100.2	102.2	105.1	111.7	117.1	124.0
	4,0	100.0	96.1	95.8	95.2	95.8	95.5	96.9	98.4	101.5	106.3	69.9
	4,5	100.0	97.5	95.3	95.2	94.6	94.5	95.9	95.1	98.5	16.6	32.8
	5,0	100.0	96.4	95.2	92.9	93.1	93.9	94.7	93.1	14.9	22.4	19.6
	5,5	100.0	96.2	95.0	92.5	94.5	93.3	93.6	20.5	13.6	23.7	12.8
Eisensulfat	3,0	100.0	95.9	95.8	93.6	93.0	86.9	69.9	58.3	13.9	3.7	2.8
	3,5	100.0	97.2	95.1	93.7	93.7	84.1	64.1	19.9	5.9	2.4	2.3
	4,0	100.0	93.1	91.3	87.0	79.7	61.0	24.6	6.6	2.3	2.1	2.9
	4,5	100.0	91.9	86.7	77.4	62.4	35.9	8.8	2.8	2.2	1.8	2.3
	5,0	100.0	87.5	81.8	68.8	52.9	32.7	10.8	2.1	7.1	1.9	3.4
	5,5	100.0	89.5	83.7	73.8	61.5	42.7	23.1	2.6	2.8	8.1	4.0

	pH-Wert	Konzentrationen der Mineralstoffverbindungen (mg/ml)										
		0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000
Mineralmix	3,0	100.0	100.0	99.2	99.8	99.3	98.8	94.6	90.2	71.6	21.7	4.4
	3,5	100.0	97.9	97.2	97.8	98.4	93.7	87.6	67.2	15.8	4.9	8.4
	4,0	100.0	94.8	94.2	93.4	89.0	80.2	58.7	14.6	3.0	5.1	7.0
	4,5	100.0	90.7	88.9	81.7	72.1	50.9	12.3	2.5	3.0	4.4	4.0
	5,0	100.0	89.9	84.4	73.4	56.3	28.5	2.2	2.8	3.2	5.1	4.5
	5,5	100.0	91.4	86.9	73.7	58.8	6.0	6.2	6.7	5.0	6.5	3.5

Getestet wurden die Auswirkungen von vier unterschiedlichen Mineralstoffverbindungen auf die Phytaseaktivität einer E. coli-WT-Phytase bei sechs unterschiedlichen pH-Werten. Die Daten sind dargestellt als prozentuale Abnahme der Phytaseaktivität, definiert als Phosphatfreisetzung (µmol) pro ml und min bezogen auf die Phosphatfreisetzung ohne Mineralstoffzugabe. Als Substrat diente 5,1 mM Na-Phytat. Neben Zinksulfat, Calciumchlorid, Mangansulfat und Eisensulfat wurde ebenfalls ein Mix der verwendeten Mineralstoffe zu gleichen Teilen getestet. Die unterschiedlichen. Für die pH-Werte 3,0-4,0 wurde ein Glycin-HCl Puffer (500 mM) verwendet und für die pH-Werte 4,5-5,5 ein Na-Acetatpuffer (500 mM). Die Phytase-Reaktion fand für 30 min bei 37 °C statt.

12 Danksagung

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle in erster Linie bei meinen Betreuern Prof. Dr. Markus Rodehutscord sowie Dr. Andreas Michels, ohne deren Zutun dieses spannende Promotionsprojekt nicht möglich gewesen wäre. Herrn Rodehutscord danke ich besonders für die herzliche Aufnahme in die Hohenheimer Arbeitsgruppe, den regelmäßigen Austausch und die damit einhergehende hervorragende Betreuung. Trotz der weiten Entfernung zwischen Köln und Hohenheim hat die Zusammenarbeit immer stehts funktioniert und Sie haben sich immer die nötige Zeit für die vielen Gespräche und Diskussionen genommen. Biotechnologie ist ein interdisziplinäres Feld und ich bin dankbar dafür, dass ich über meinen Tellerrand schauen durfte und an der Schnittstelle zur Agrarwissenschaft einiges dazulernen konnte.

Ein besonders großer Dank geht an Dr. Vera Sommerfeld und Dr. Thomas Horn, die mich während des gesamten Projektes stehts begleitet haben und mir bei Problemen und Fragen zur Seite standen. Vielen Dank für die vielen inspirierenden Gespräche, die Diskussionen von Ergebnissen und die Unterstützung während des Tierversuches sowie bei den biochemischen Arbeiten im Labor.

Ich danke dem Team der Tierernährer in Hohenheim für die immer freundliche und herzliche Atmosphäre während meiner Aufenthalte, die vielen interessanten Gespräche und die immer sehr große Hilfsbereitschaft untereinander. Es war mir immer eine große Freude, nach Hohenheim zu fahren und ich habe die Zusammenarbeit sehr genossen. Ich bin auch Dr. Margit Schollenberger sehr dankbar für die großzügige Weitergabe ihrer Expertise, für ihre hilfreichen Anregungen in allen Phasen dieser Arbeit, die vielen warmen Worte und eine immer offene Türe.

Vielen Dank an das Team der Versuchsstation in Eningen, insbesondere an Heiko Stegmann für die sehr geschätzte Hilfe bei dem Tierversuch. Ich danke Melanie Liebscher, Helga Terry, Helga Ott und Melanie Berger für die hervorragende chemische Analytik und für ihre Hilfe beim Erlernen der Techniken im Labor.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei dem wundervollen Team der EW Nutrition in Köln. Vielen Dank an alle Kolleginnen und Kollegen für die angenehme Zeit in den letzten Jahren, die vielen Treffen, die seelische und moralische Unterstützung sowie Ermutigung in schwierigen Phasen des Projektes, besonders zu Pandemiezeiten.

Zu guter Letzt geht ein großer Dank an meine Familie und meine Frau, ihr wart ein großer Rückhalt für mich. Danke für die uneingeschränkte Unterstützung, liebevollen Ermutigungen und den steten Glauben in mich und an meine Arbeit. Ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen. Ihr habt wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Alexander Metten

23.10.1991

Münstereifeler Straße 43
50937 Köln

Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: verheiratet

Telefon: +49 172 993 84 85
Mail: alexandermetten@gmx.de
LinkedIn: www.linkedin.com/in/alexander-metten992786132

Kurzprofil

Biotechnologe mit starkem Hintergrund in der industriellen Biotechnologie. Während der Arbeiten an meinem Masterprojekt und anschließender Promotion in Kooperation mit der Universität Hohenheim, sammelte ich wertvolle Erfahrungen im Bereich der Enzymentwicklung, Charakterisierung und Produktion.

Berufserfahrung

03/2022 – heute
Process Development Scientist, BSV-BioScience GmbH, Baesweiler

03/2018 – 02/2022
Wissenschaftlicher Mitarbeiter, EW Nutrition Innovation GmbH & Co. KG, Köln

Ausbildung

04/2019 – 03/2023
Promotion im Bereich der industriellen Biotechnologie
Universität Hohenheim
Titel: Dr. sc. agr.
Forschungsthema: Entwicklung und ernährungs-physiologische Bewertung mikrobieller Hybrid-Phytasen
Abschlussnote: 1.0 (magna cum laude)

04/2016 – 02/2018
Biotechnologie (Master of Science) + Forschungspraktikum
Fachhochschule Aachen, Campus Jülich
Schwerpunkt: Industrielle- und medizinische Biotechnologie
Abschlussnote: 1,3

10/2012 – 03/2016
Biotechnologie (Bachelor of Science) + Praxissemester
Fachhochschule Aachen, Campus Jülich
Praxisorientierter Studiengang mit technischem Fokus
Abschlussnote: 1,7

09/2004 – 07/2011
Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
Gesamtschule Kürten
Abschlussnote: 2,3