

Einfluss von Xylanasen auf die Darmflora

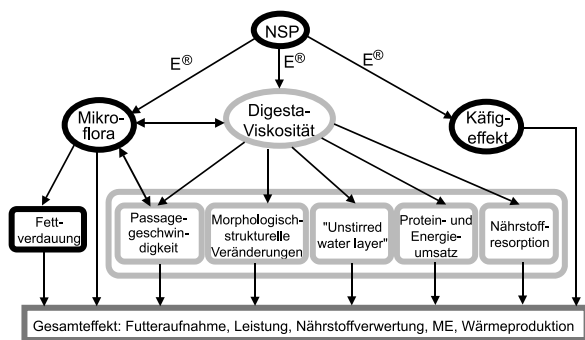
Prof. Ortwin Simon, Dr. Katrin Hübener, Kerstin Hirsch, Lutz Beckmann, Dr. Wilfried Vahjen (Berlin)

1. Einleitung

Die Einbeziehung von Xylanasen insbesondere in Rationen für Masthühner, Puten und in geringerem Umfang für Ferkel ist weitgehend praxisüblich, wenn Weizen und Triticale (evtl. auch Roggen) als Getreidekomponenten verwendet werden. In der Europäischen Union haben annähernd 40 Präparate, die Xylanaseaktivitäten allein oder in Kombination mit anderen Enzymaktivitäten enthalten, eine vorläufige Zulassung.

Der Gesamteffekt dieser Futterzusatzstoffe besteht in einer Verbesserung von Leistungsparametern, wie Lebendmassezunahme und Futteraufwand (FRIESEN et al., 1992; BEDFORD, 1995), einer Reduzierung des Auftretens von klebrigen Exkrementen (CHOCT und ANNISON, 1992) sowie einer Erhöhung der umsetzbaren Energie des Getreides bzw. der Gesamtration (DÄNICKE et al., 1999; DUSEL et al., 1997; WARD, 1996). Die Wirkungsmechanismen, die zu diesen Effekten führen, waren zunächst wenig bekannt und sind zum Teil erst in den letzten Jahren untersucht worden. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Mechanismen, die höchstwahrscheinlich an dem Gesamteffekt beteiligt sind.

Abbildung 1: Mögliche Wirkungsebenen von Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) und NSP-hydrolysierenden Enzymen (E®)



Als Schlüsselreaktionen bei der Wirkung von Xylanasen und anderer Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP)-hydrolysierender Enzyme sind die Senkung der Digestivviskosität und wahrscheinlich auch das Aufweichen des sogenannten Käfigeffektes zu betrachten. Diese Reaktionen sind auf die partielle Hydrolyse sowohl der löslichen als auch der unlöslichen NSP zurückzuführen. Während bei der Aufweichung des Käfigeffektes eine direkte Erhöhung der Verdaulichkeit der Nährstoffe des Getreides denkbar ist, wirkt sich die Viskositätssenkung auf zahlreiche morphologische, strukturelle sowie funktionelle Parameter des Verdauungstraktes aus. Mit einer Reduzierung der Digestivviskosität sind folgende Reaktionen assoziiert: Beschleunigung der Digestivpassage (ALMIRALL und ESTEVE-GARCIA, 1994), Herabsetzung der relativen Masse und Länge des Verdauungstraktes (SIMON, 1998), Änderungen der Zottenmorphologie im Dünndarm und reduzierte Proliferationsrate von Enterozyten (GEE et al., 1996), reduzierte Proteinsyntheserate der Gewebe des

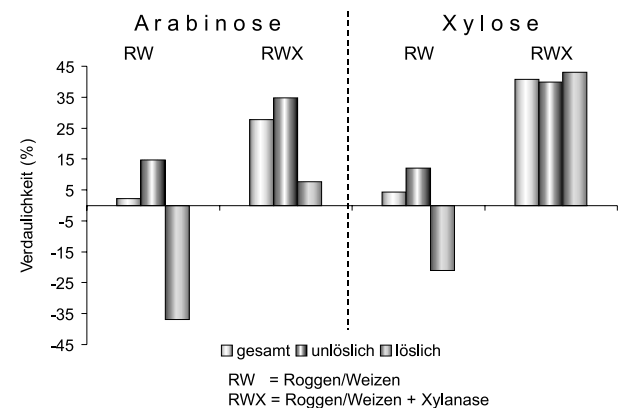
Verdauungstraktes (DÄNICKE et al., 2000) und verbesserte praecaecale Nährstoffverdaulichkeit, besonders der Fette (DÄNICKE et al., 1997; ALMIRAL et al., 1995).

Relativ wenig ist bekannt, in welcher Weise die Darmflora durch Xylanasezusätze beeinflusst wird und welche Konsequenzen dies für den Gesamteffekt und das Tier hat. Im Folgenden werden Untersuchungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe zu dieser Fragestellung dargestellt.

2. Mikrobieller Abbau von Pentosanen im Dünndarm - Wirkung von Xylanasezusatz

Diese Zusammenhänge wurden an Ferkeln (24 kg LM) untersucht, die eine Ration mit den Getreidekomponenten Weizen und Roggen (ohne und mit Xylanasezusatz-ZY68) erhielten und mit einer duodenalen Brückenfistel sowie einer postvalve T-Fistel im Caecum versehen waren (BARTELT et al., 2001). Da in diesen Getreidearten die Pentosane fast ausschließlich als Arabinoxylane vorliegen, wurde die praecaecale Verdaulichkeit anhand der Arabinose- und der Xyloseverdaulichkeit aus der Gesamtfraktion sowie den löslichen bzw. den unlöslichen Arabinoxylenen bestimmt (Abb. 2).

Abbildung 2: Ileale Verdaulichkeit von Arabinoxylenen bei Ferkeln – Einfluss eines Xylanasezusatzes



Dabei ist zu beachten, dass eine Hydrolyse von Arabinoxylenen im Dünndarm nur durch Enzyme von Mikroorganismen erfolgen kann, da keine körpereigenen Enzyme des Tieres dafür existieren. Ohne Zusatz von Xylanase lag die Verdaulichkeit sowohl für Arabinose als auch für Xylose aus der Gesamtfraktion unter 5%. Betrachtet man aber die unlöslichen und löslichen Pentosane getrennt, ergibt sich ein differenzierteres Bild. Während die praecaecale Verdaulichkeit der unlöslichen Fraktion bei 10 bis 15% liegt, ist für die lösliche Fraktion eine stark negative Verdaulichkeit zu beobachten. Dieser Befund zeigt, dass die Mikroorganismenpopulation des Dünndarmes in erster Linie eine Solubilisierung von Pentosanen bewirkt, indem unlösliche Arabinoxylene in eine lösliche Form überführt werden. Bei Einsatz einer Xylanase als Futterzusatzstoff wird die Verdaulichkeit bis Dünndarmende so-

wohl für die Gesamtfraktion als auch für die unlöslichen Pentosane auf 30 bis 40 % erhöht. Außerdem liegt auch eine positive Verdaulichkeit für die lösliche Fraktion vor. Daraus ist zu schlussfolgern, dass durch den Xylanase-zusatz im Dünndarm sowohl der Abbau unlöslicher als auch löslicher Arabinoxylane wesentlich erhöht wird. Anhand dieser Ergebnisse kann aber nicht gesagt werden, ob dafür die Aktivität der zugesetzten Xylanase allein verantwortlich ist oder ob auch die Förderung einer spezifischen zur NSP-Verwertung befähigten Flora dabei eine Rolle spielt.

3. Einfluss von Xylanasen auf die Mikroorganismenpopulation im Dünndarm und deren Stoffwechselaktivität

3.1 Anwendung klassischer Methoden der Mikrobiologie

Zur Beurteilung des Einflusses von Nahrungsfaktoren auf die mikrobielle Besiedlung des Verdauungstraktes kann die Methode der Anzucht von Proben aus dem Verdauungstrakt auf Selektivnährmedien herangezogen werden. Auf diese Weise kann man bei Anwendung von Verdünnungsreihen die Zahl kolonienbildender Einheiten (KBE oder CFU) bestimmter Gruppen von Bakterien erfassen, die nicht nur einer Gattung angehören, wie Enterobakterien, gram-positive Kokken oder Milchsäurebakterien. Dabei kann man noch zwischen luminalen Bakterien (Digestaprobe) und gewebeassoziierten Bakterien (Mucosaprobe nach Waschen) differenzieren. Eine der ersten Untersuchungen dieser Art an Broilern (VAHJEN et al., 1998), die Weizen mit hoher Extraktviskosität als alleinige Getreidekomponente mit und ohne Xylanasezusatz (ZY68) erhielten, hat verdeutlicht, dass es durch den Xylanasezusatz offenbar zu Verschiebungen des Artenspektrums im Verdauungstrakt kommt (Abb. 3 bis 5).

Abbildung 3: Entwicklung luminaler Enterobakterien im Dünndarm von Broilern

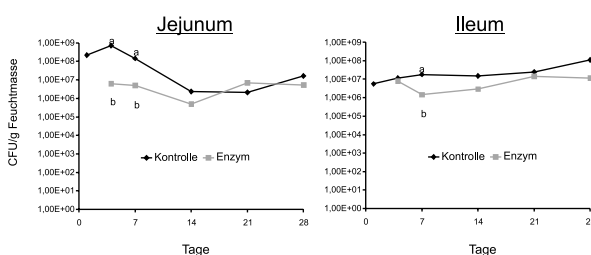


Abbildung 4: Entwicklung gewebeassoziiierter gram-positiver Kokken im Dünndarm von Broilern

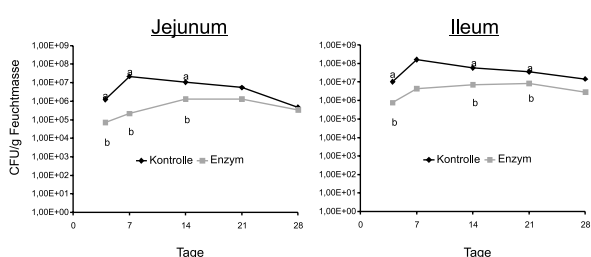
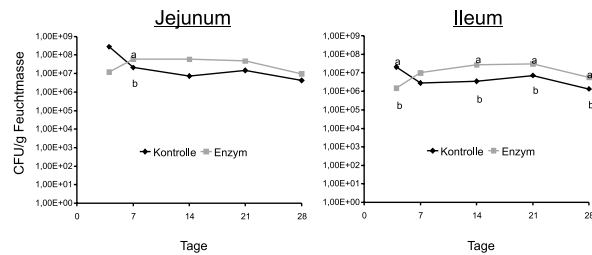


Abbildung 5: Entwicklung gewebeassoziiierter Lactobacillen im Dünndarm von Broilern



Die wesentlichen Beobachtungen dieses Versuches waren reduzierte Keimzahlen luminaler und gewebeassoziiierter Enterobakterien und gram-positiven Kokken während der ersten 2 bis 3 Lebenswochen sowie erhöhte Keimzahl von gewebeassoziierten Lactobacillen ab der zweiten Lebenswoche durch die Xylanasesupplementierung. In folgenden, ähnlichen Untersuchungen konnten die Befunde zu den Enterobakterien und zu den gram-positiven Kokken bestätigt werden, nicht aber zu den Lactobacillen (HÜBENER et al., 1998).

Diese Art von Ergebnissen bestätigen die Vermutung einer Beeinflussung der Bakteriengemeinschaften im Dünndarm, lassen aber kaum Interpretationen über deren Bedeutung für das Wirtstier zu. Ein Grund dafür ist, dass mit den Selektivnährmedien Mikroorganismengruppen erfasst werden, deren Vertreter völlig harmlos sein können oder aber Pathogenitätsfaktoren tragen können, wie es sowohl für Enterobakterien als auch für gram-positive Kokken der Fall sein kann. Diese weiter zu differenzieren ist sehr aufwendig und für Serienuntersuchungen kaum praktikabel. Aber die beschriebene Methodik ist noch aus einem anderen Grunde nicht befriedigend. Es wird von einer Zahl zwischen 300 bis 500 Mikroorganismenarten ausgegangen, die den Verdauungstrakt besiedeln, wovon aber nur 10 bis 50 % außerhalb des Verdauungstraktes kultivierbar sind. Das bedeutet, wir erfahren bei Anwendung derartiger Methoden weitaus weniger als die „halbe Wahrheit“.

3.2 Anwendung der 16S rRNA-Sondenhybridisierung zur Untersuchung der Darmflora auf Artenebene

Mit molekularbiologischen Methoden ist es möglich, eine semiquantitative (quantitative) Erfassung von Populationsgröße bzw. -aktivität von Mikroorganismen auch auf Artenebene im Verdauungstrakt zu ermöglichen, auch wenn es sich um nicht oder schwer kultivierbare Mikroorganismen handelt. Hierzu werden markierte Oligonucleotidsonden entwickelt, die aus 18 bis 30 Basen bestehen, deren Sequenz spezifisch nur für eine bestimmte Gattung (Gruppensonde) oder z. B. nur für eine Art (artspezifische Sonde) ist. Als besonders geeignet hat es sich erwiesen, mit Sonden für ribosomale RNA der 16S-Untereinheit von Ribosomen (16S rRNA) zu arbeiten. Diese besitzt neben sehr konservierten Bereichen der Basensequenz auch stark variable Bereiche, so dass sich meist sowohl Gruppensonden als auch artspezifische Sonden finden lassen, die nicht mit Nukleinsäuren anderer Mikroorganismen hybridisieren. Das methodische Vorgehen ist in den Abbildungen 6 und 7 schematisch dargestellt. Da Ribosomen die „Proteinfabriken“ der Bakterienzelle darstellen, korrelieren die Ergebnisse der 16S rRNA-Hybridisi-

sierung mit der Stoffwechselaktivität einer speziellen Bakterienart bzw. einer Bakteriengruppe.

Abbildung 6: Methodik

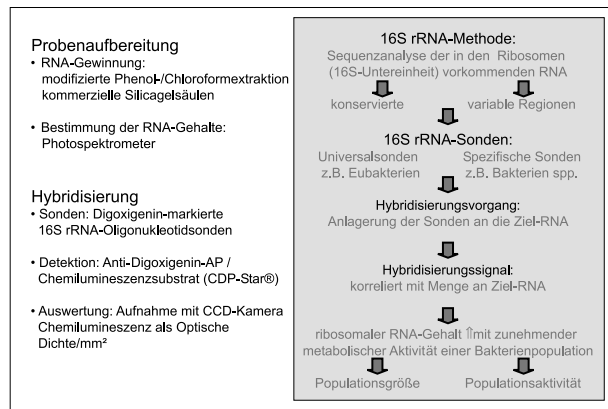
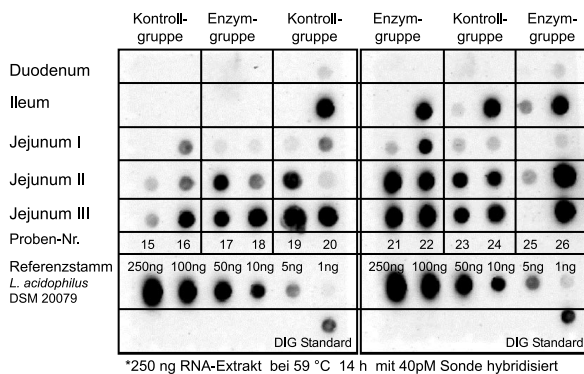


Abbildung 7: Hybridisierung von RNA-Extrakten aus dem Dünndarm mit 16S rRNA-Oligonukleotidsonden am Beispiel von *L. acidophilus**



Am folgenden Beispiel wird die Anwendung einiger artspezifischer 16S rRNA-Sonden für die Gattung *Lactobacillus* demonstriert. Als Probenmaterial diente Dünndarmdigesta von Ferkeln, die drei Wochen lang nach dem Absetzen eine Ration mit Weizen/Roggen als Getreidekomponente erhielten - je 6 Tiere mit bzw. ohne Zusatz einer Xylanase (ZY68). In Abbildung 8 sind die Ergebnisse, die mit der Gruppensonde für die Gattung *Lactobacillus* ermittelt wurden, dargestellt. Danach gibt es eine Tendenz zu einer gesteigerten Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen dieser Gattung im mittleren und terminalen Jejunum sowie im Ileum unter dem Einfluss der Xylanasen.

Bei Anwendung artspezifischer Sonden für *L. acidophilus*, *L. amylophilus* und *L. reuteri* (Abb. 9 bis 11) wird deutlich, dass insbesondere *L. reuteri* bei Xylanasezusatz in seiner Stoffwechselaktivität gefördert wurde. Diese *Lactobacillus*-Art ist als Bacteriocinbildner bekannt und wurde auch auf seine probiotische Wirksamkeit überprüft. Anhand der enormen Streuungen ist aber auch zu erkennen, dass die Mikroorganismengemeinschaften im Dünndarm der einzelnen Tiere in sehr unterschiedlicher Weise auf derartige nutritive Faktoren reagieren.

Abbildung 8: Metabolische Aktivität der *Lactobacillus*-population im Dünndarm von Ferkeln

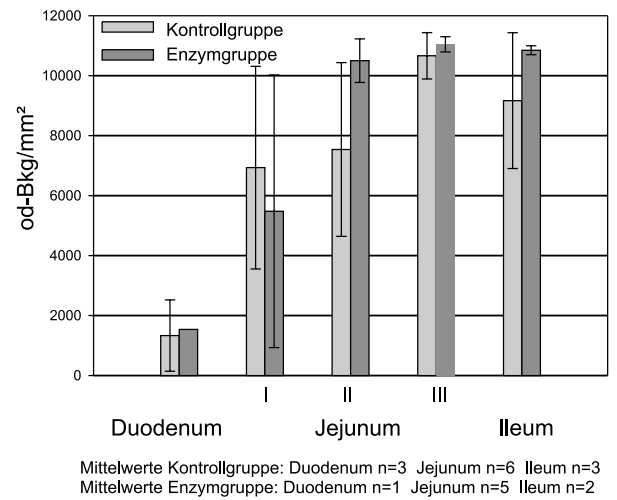


Abbildung 9: Metabolische Aktivität von *L. Acidophilus* im Dünndarm von Ferkeln

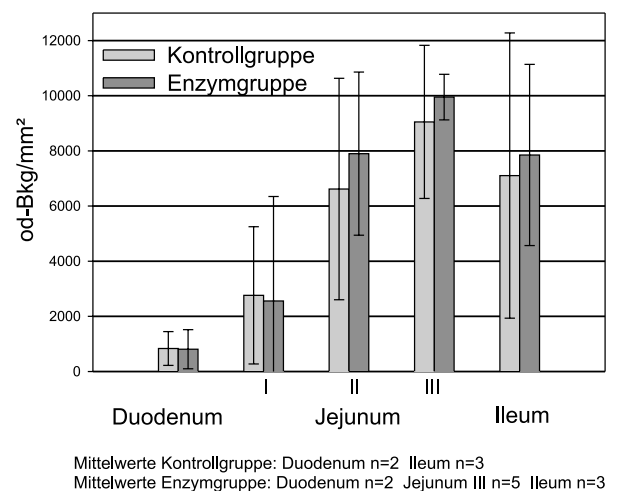


Abbildung 10: Mittlere metabolische Aktivität von *L. Amylophilus* im Dünndarm von Ferkeln

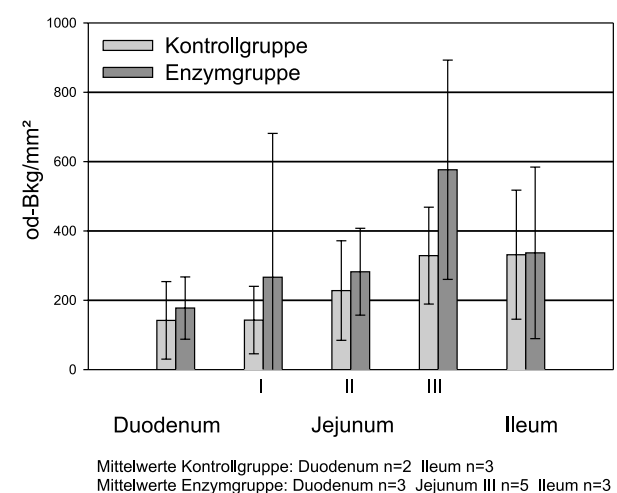
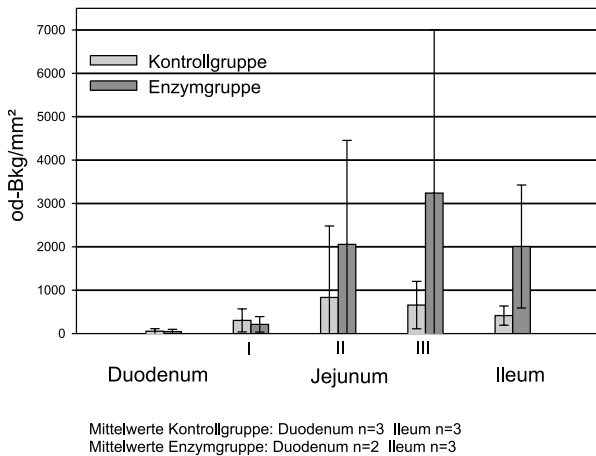


Abbildung 11: Metabolische Aktivität von *L. Reuteri* im Dünndarm von Ferkeln

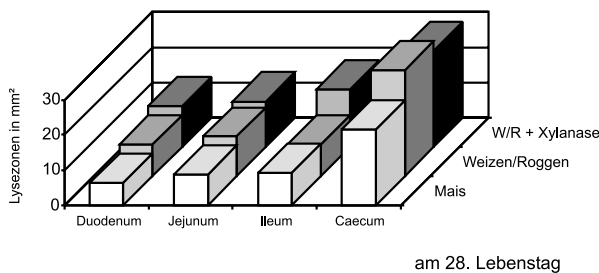


3.3 Anpassung der Darmflora an die NSP-Verwertung - oder wie Xylanasen einen „Dominoeffekt“ auslösen

Bei der Beurteilung der physiologischen Bedeutung von nutritiv bedingten Veränderungen der Darmflora sind die Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen von größtem Interesse. Wie weiter oben dargestellt, ist eine dieser Stoffwechselleistungen der Abbau von NSP. Da mit dem Futter zugeführte Xylanasen eine partielle Hydrolyse von Pentosanen bewirken (s. Abb. 2), war zu vermuten, dass spezifisch Mikroorganismen gefördert werden, die Arabinoxylane verwerten können und die selbst Xylanasebildner und möglicherweise auch Produzenten anderer NSP-hydrolysierender Enzyme sind. Dieser Hypothese wurde mit verschiedenen Versuchsansätzen nachgegangen. Als Versuchstiere dienten jeweils Broilerküken, die vom ersten Lebenstag an eine der Rationen mit Getreideanteil Mais oder Weizen/Roggen erhielten, letztere Ration mit bzw. ohne Xylanasezusatz.

Eine Möglichkeit ist die Messung der β -Glucanaseaktivität (die im Verdauungstrakt nur mikrobiellen Ursprungs ist) in der Digesta der einzelnen Darmanschnitte nach Verabreichung der genannten Rationen (Abb. 12).

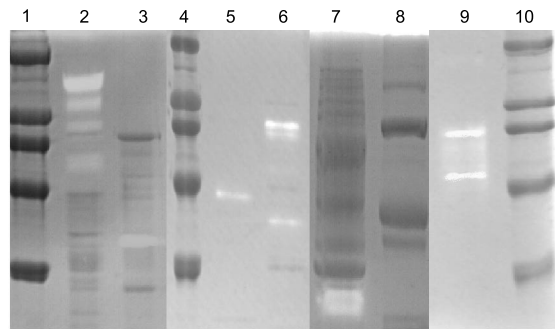
Abbildung 12: Bakterielle Enzymaktivität von β -Glucanasen



- Ort höchster Aktivität ist das Caecum
- Weizen-Roggen-Futter verstärkt die Aktivität
- Xylanase steigert NSP-Abbau (β -Glucan) im Dünndarm

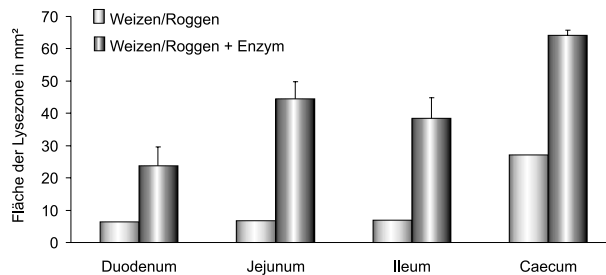
Im Vergleich zur Mais basierten Ration bewirkt die Weizen/Roggen Ration einen Anstieg der β -Glucanaseaktivität im Caecum. Die Supplementation der gleichen Diät mit einer Xylanase (frei von Nebenaktivitäten anderer NSP-hydrolysierender Enzyme) führt zu einem Anstieg der β -Glucanaseaktivität auch im Dünndarm und das insbesondere im Ileum, woraus die stimulierte Etablierung einer NSP-verwertenden Mikroorganismenpopulation im Dünndarm unter Wirkung der Xylanase abgeleitet werden kann. Im Rahmen eines DFG-Projektes unserer Arbeitsgruppe sind β -Glucanasebildner im Verdauungstrakt von Küken isoliert worden. Als β -Glucanaseproduzenten sind verschiedene Arten der Gattungen *Clostridium*, *Bacteroides*, *Streptococcus* und *Enterococcus* identifiziert worden (Abb. 13, die hellen Lysezone zeigen auf diesen Zymogrammen β -Glucanaseaktivität an). Quantitativ scheint *Enterococcus faecium* als Glucanasebildner im vorderen Verdauungstrakt die größte Bedeutung zu haben.

Abbildung 13: SDS / PAGE Zymogramme 1,3-1,4- β -Glucanase spaltender Bakterienisolate (Zusammenfassung mehrerer Zymogramme)



1, 4, 10 = Hochmolekularer Proteinstandard, 8 = niedrigmolekularer Proteinstandard
2 = *Clostridium oroticum*, 3 = *Clostridium viride*, 5 = *Streptococcus bovis*,
6 = *Clostridium perfringens*, 7 = *Bacteroides ovatus*, 9 = *Enterococcus faecium*.

Abbildung 14: Xylanaseaktivität im Digestaüberstand von Broilern am 28. Lebenstag

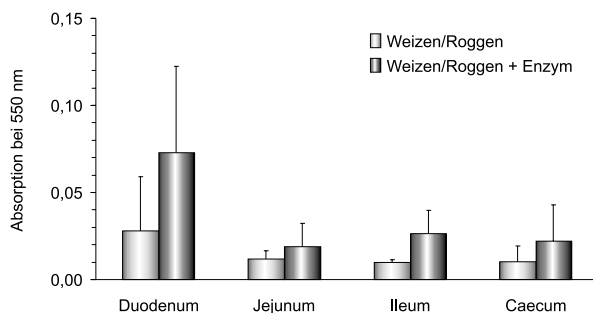


Bei Xylanasesupplementation der Weizen-Roggen-Ration wurde die Xylanaseaktivität in allen geprüften Darmabschnitten auf ein Mehrfaches erhöht (Abb. 14). Dies muss in erster Linie auf die exogen supplementierte Xylanase zurückgeführt werden. Allerdings ist auch hierbei ein Dominoeffekt zu beobachten, d. h. stimulierte mikrobielle Expression von Xylanase im Verdauungstrakt durch exogene Zufuhr einer Xylanase. Der Nachweis hierfür war kompliziert zu erbringen, ist aber mit der Zymogramm-

technik schließlich gelungen. Dabei konnte in der Digesta von Xylanase supplementierten Tieren neben der aktiven Bande des mit dem Futter zugeführten Enzyms im niedermolekularen Bereich zusätzlich das Auftreten einer Xylanaseaktivität im hochmolekularen Bereich nachgewiesen werden. In Digesta von Küken, die die Weizen/Roggen-Ration ohne Xylanase erhielten, fehlten beide Xylanase-Aktivitätsbanden.

Ein weiteres Indiz für die Anpassung einer spezifischen Bakterienpopulation mit der Fähigkeit der Verwertung von Arabinoxylanen durch die Xylanasen im Futter liefern Versuche zur Wachstumskapazität von Proben aus dem Dünndarm und dem Caecum in Minimalmedien mit Weizen-Arabinosylan als einziger Energiequelle (Abb. 15). Bei dieser Technik wird nach Inkubation bei 40 °C für 18 Stunden die Trübungsmessung vorgenommen, die ein Maß für die Zellvermehrung ist. Das stimulierte Zellwachstum von Ansätzen mit Digesta von Tieren, die Xylanase mit dem Futter erhielten, spricht für die Anwesenheit einer größeren Zahl von Mikroorganismen, die in der Lage sind, Arabinoxylane als Energiequelle zu nutzen.

Abbildung 15: Wachstumskapazität luminaler Xylanverwerter in der 6. Lebenswoche



4. Schlussfolgerungen

- Unter dem Einfluss von Xylanasen als Futterzusatzstoff kommt es zu Modifikationen der luminalen sowie der gewebeassoziierten Mikroorganismenpopulation im Intestinaltrakt sowohl bei Masthühnern als auch bei Ferkeln.
- Mit Kultivierung auf Selektivnährmedien wird regelmäßig eine Reduzierung der Enterobakterien und gram-positiven Kokken nachgewiesen und (weniger gut reproduzierbar) eine Zunahme von Milchsäurebakterien.
- Innerhalb der Gattung *Lactobacillus* reagieren die einzelnen Arten unterschiedlich intensiv auf einen Xylanasezusatz zum Futter. Insbesondere die Stoffwechsellaktivität von *L. reuteri* scheint stimuliert zu werden.
- Xylanasezusätze zum Futter bewirken eine Stimulierung einer Bakterienpopulation im Dünndarm, die in der Lage ist, Pentosane und vermutlich auch andere NSP energetisch zu verwerten. Es erfolgt eine Lokalisationsverlagerung dieser spezifischen Keime in vordere Bereiche des Intestinaltraktes.

5. Literaturverzeichnis

- ALMIRALL, M., M. FRANCESCH, A. M. PEREZ-VENDRELL, J. BRUFAU, E. ESTEVE-GRACIA (1995): The differences in intestinal viscosity produced by barley and (-glucanase alter digesta enzyme activity and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. J. Nutr. 125, 947-955
- ALMIRALL, M., E. ESTEVE-GARCIA (1994). Rate of passage of barley diets with chromium oxide: influence of age and poultry strain and effect of -glucanase supplementation. Poult. Sci. Ass. 73, 1433-1440
- ANNISON, G. (1992). Commercial enzyme supplementation of wheat-based diets raises ileal glucanase activities and improves apparent metabolisable energy, starch and pentosan digestibility in broiler chickens. Anim. Feed Sci. Technol. 38, 105-121
- BARTELT, J., L. BURACZEWSKA, E. SIECH, F. WIESE, A. JADAMUS, O. SIMON (2001): Endogenous N contribution to digesta of the small intestine of growing pigs fed semi-synthetic and cereal-based diets causing various digesta viscosities. In Lindberg, J.E., B. Ogle, B. (Herausgeber); Digestive physiology of pigs, CABI Publishing, 124-126
- BEDFORD, M. R. (1995). Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. Animal Feed Science and Technology. 53, 145-155
- DÄNICKE, S., W. BOTTCHER, H. JEROCH, J. THIELEBEIN, O. SIMON (2000): Replacement of soybean oil with tallow in rye-based diets without xylanase increases protein synthesis in small intestine of broilers. J. Nutr. 130, 827-834
- DÄNICKE, S., E. FRANKE, E. STROBEL, H. JEROCH, O. SIMON (1999): Effect of dietary fat type and xylanase supplementation in rye containing diets on energy metabolism in male broilers. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 81, 90-102
- DÄNICKE, S., O. SIMON, H. JEROCH, M. BEDFORD (1997): Interactions between dietary fat type and xylanase supplementation when rye-based diets are fed to broiler chickens. Br. Poult. Sci. 38, 537-545
- DUSEL, G., H. KLUGE, K. GLASER, O. SIMON, G. HARTMANN, J.V. LENSCHERKEN, H. JEROCH (1997): An investigation into the variability of extract viscosity of wheat - Relationship with the content of non-starch-polysaccharide fractions and metabolisable energy for broiler chickens. Arch Anim. Nutr. 50, 121-135
- FRIESEN, O. D., W. GUENTER, R.-R. MARQUARDT, B.-A. ROTTER (1992): The effect of enzyme supplementation on the apparent metabolizable energy and nutrient digestibility of wheat, barley, oats and rye for the young broiler chick. Poult. Sci. Ass. 71, 1710-1721
- GEE, J. M., W. LEE-FINGLAS, G.W. WORTLEY, I.T. JOHNSON (1996): Fermentable carbohydrates elevate plasma enteroglucagon but high viscosity is also necessary to stimulate small bowel mucosal cell proliferation in rats. J. Nutr. 126, 373-379
- HÜBENER, K., W. VAHJEN, O. SIMON (1998): Influence on the content of non starch polysaccharides in feed on the microflora in broiler chicken. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 7, 77
- SIMON, O. (1998): The mode of action of NSP hydrolysing enzymes in the gastrointestinal tract. J. Anim. Feed Sci. 7, 115-123
- VAHJEN, W., K. GLÄSER, O. SIMON (1998): Influence of xylanase supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. J. Agr. Sci., 130, 489-500

Danksagung

Die vorgestellten Versuchsergebnisse stammen aus verschiedenen durch Drittmitteln geförderten Projekten. Dazu gehören die DFG-Sachbeihilfen Si 561/1-3 und Si 561/2-1 sowie Forschungsprojekte, die von der Lohmann Animal Health GmbH unterstützt wurden. Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der LAH für das Interesse an dieser Art von Grundlagenforschung und für die bereitgestellten Personal- und Sachmittel.