©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

wesentlich erweiterte Ausgabe 1981 dieses Merkblattes weist in leicht verständlicher Textierung auf Gefahrenquellen für die Gewässer der Landwirtschaft hin und zeigt Möglichkeiten zur Vermeidung von Gewässerschäden auf. Der Landwirt soll durch dieses Merkblatt angeleitet werden, durch entsprechende Bewirtschaftungsweisen, fachkundige Ausbringung von Dünge- und Pflanzenschutzmitteln sowie sachgemäße Beseitigung der Abwässer und Abfälle einen Beitrag zum Schutz unserer Gewässer zu leisten.

Das Merkblatt wird kostenlos von den Landwirtschaftskammern verteilt, kann aber auch direkt vom Österreichischen Wasserwirtschaftsverband, 1010 Wien, An der Hülben 4, angefordert werden.

| Österreichs Fischerei | Jahrgang 34/1981 | Seite 234 – 242 |
|---|---|---|

Rudolf Hofer und Tibor Mátrai

# Hydrolyse von Sojaprotein durch den Verdauungssaft des Karpfens in in-vitro-Experimenten*)

Warm Water Fish Breeding Farm, Szazhalombatta, Ungarn
Institut für Zoophysiologie, Universität Innsbruck, Österreich, und
Regierungsamt für technische Entwicklung, Budapest, Ungarn.

*) Mit Unterstützung des Regierungsamtes für technische Entwicklung, Budapest, und des „Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Österreich, „Projekt Nr. 2745.

Wir danken Herrn Dipl.-Agr. Istvan Tölg für die Zur-Verfügungstellung des Arbeitsplatzes, sowie Frau Sissi Knapp und Herrn Dr. Tibor Dévényi für die Durchführung der Aminosäurenanalysen.

## Einleitung

Seit der Verteuerung des Fischmehls wird in der gesamten Tierzucht, also auch in der Teichwirtschaft, das tierische Eiweiß zunehmend durch pflanzliches ersetzt. Das viel billigere pflanzliche Eiweiß ist jedoch vielfach kein vollwertiger Ersatz: oft sind wichtige essentielle Aminosäuren, vor allem Lysin, in zu geringer Menge vorhanden (BLOCK and MITCHELL 1946) oder starke Proteaseinhibitoren, wie etwa in der Sojabohne, vermindern die Verdaulichkeit (RACKIS 1974, SANDHOLM et al 1976). Weiters ist die Verfügbarkeit der vorhandenen Aminosäuren nicht nur von der Art des Proteins, sondern auch von dessen Vorbehandlung abhängig (MELNICK et al 1946, ELDRED and RODNEY 1946, BUCHANAN 1969). Ausführliche Fütterungsexperimente mit Zuwachsmessungen sind sicher die aussagekräftigste, aber auch zeitraubendste und teuerste Methode, die Qualität von Proteinen zu testen; sie sind aber kaum routinemäßig durchzuführen. Deshalb wird allgemein eine rasche und billige Methode gefordert (ADAMS 1974), mit deren Hilfe die biologische Wertigkeit von Proteinen getestet werden kann. Eine der Möglichkeiten besteht darin, die Verdaulichkeit von Proteinen in *in vitro*-Experimenten zu untersuchen, bzw. die daraus entstandenen Spaltprodukte zu analysieren. Solche *in-vitro*-Experimente werden vielfach mit reinen Enzympräparaten (Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin) oder auch mit Pankreatin durchgeführt (SAUNDERS et al 1973, AKESON and STAHMANN 1964, BUCHANAN 1969, STEINHART 1977). Bei all diesen Untersuchungen sind die Bedingungen auf Säuger abgestimmt. Es wäre deshalb sicher falsch, diese Resultate auf die Verhältnisse bei Fischen anzuwenden. Vor allem die Verdauungsprozesse bei Cypriniden unterscheiden sich wesentlich von denen der Säuger:

1) Cypriniden besitzen keinen Magen, es findet demnach weder eine Säuredenaturierung der Proteine noch eine Vorverdauung durch Pepsin statt. Die basischen Endopeptidasen des Pankreas (Trypsin, Chymotrypsin) müssen deshalb in der Lage sein – ähnlich wie jene der Avertebraten – native Proteine zu hydrolysieren. Trypsin und Chymotrypsin höherer Vertebraten sind im allgemei-

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at
nen dazu kaum fähig. Weiters ist die Substrataffinität der Cyprinidentrypsine um mehr als eine Zehnerpotenz höher als die der Säugertrypsine (HOFER et al 1975).

2) Die Verdauungstemperatur liegt bei Fischen, je nach Art, Vorkommen und Jahreszeit zwischen 4 und 28°C, also wesentlich niedriger als bei Säugern.

3) Die *in-vitro*-Versuche der oben erwähnten Autoren weisen Inkubationszeiten von 1 – 2 Tagen auf. Die Verweildauer der Nahrung ist aber bei Cypriniden wesentlich kürzer. Die Dauer der Darmpassage bei 15 – 20 g schweren Karpfen liegt bei 6 – 7 Stunden (SCHADE und KAUSCH 1978), während bei Rotaugen und Rotfedern (16 – 22 g) in Abhängigkeit der konsumierten Pflanzenmenge Werte zwischen 3 und 8 Stunden gefunden worden sind (HOFER und NIEDERHOLZER 1980).

Aus all diesen Gründen können Pepsin-Pankreatin-Verdauungsindices, die bei 37°C und einer Hydrolysezeit von 24 – 48 Stunden, unter Verwendung von zum Teil stark verdünnten Säugerenzymen gewonnen worden sind, keinesfalls als Grundlage für Aussagen über die Verwertbarkeit von Proteinen bei Fischen, insbesondere bei Cypriniden, herangezogen werden.

## Material und Methoden

Von etwa 20, ausschließlich mit Kunstfutter ernährten, etwa 20cm großen Karpfen wurde der Darminhalt der ersten 4/5 des Verdauungstraktes präpariert, zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Dieser Darmsaft diente als Enzymlösung.

Als Substrat für die *in-vitro*-Verdauungsversuche wurde in der Reibschale zu feinem Pulver verriebener, von Inhibitoren weitgehendst befreiter Sojaschrot (49% Protein) bzw. Casein (93% Proteingehalt) verwendet. Um die Konzentration der Verdauungsenzyme und den ph-Wert in annähernd natürlichen Verhältnissen zu halten, mußten zu jeweils 230mg Soja- bzw. Caseinpulver und 470$\mu$l Darmsaft noch 300$\mu$l 5N Tris-HCL-Puffer, pH 8,7 zugesetzt werden. Dieses dickflüssige Gemisch wurde in Eprouvetten in ein Wasserbad von 25°C gestellt und während des Versuches mit Hilfe kleiner Magneten und einem Magnetrührer ständig durchmischt. Parallel dazu wurden Kontrollansätze mit Soja und Puffer, sowie mit Darmsaft und Puffer vorbereitet. In verschiedenen Zeitabständen (0 – 7 Stunden) wurde die Reaktion durch Zugabe von 770$\mu$l 20%iger Sulfosalicylsäure gestoppt. Die Proben wurden über Nacht in den Kühlschrank gestellt und am nächsten Tag zentrifugiert. Im Überstand wurden Peptide nach BIURET und Ninhydrin-positive Substanzen, hauptsächlich freie Aminosäuren (MOORE und STEIN 1948), bestimmt. Da beide Reaktionen mit Tris-HCL-Puffer positiv reagieren, mußte von den Proben jeweils ein Leerwert abgezogen werden.

Im Sediment wurden nach mehrmaligem Waschen mit Wasser die Proteine mit Natronlauge extrahiert (DOWGIAO 1975) und nach BIURET bestimmt. In einem Experiment mit Soja als Substrat wurden die Aminosäuren in einem Aminosäurenanalysator (Fa. Labotron) getrennt (BENSON and PATTERSON 1971).

Bei der Präparation des Karpfendarmes wurde das Trockengewicht des Darminhaltes, der pH-Wert mit Hilfe von Spezial-Indikatorpapier (Merck) und die Proteaseaktivität mit Azocasein als Substrat (CHARNEY and TOMARELLI 1947) in verschiedenen Darmabschnitten bzw. während des *in-vitro*-Experimentes bestimmt.

## Ergebnisse

Der durchschnittliche Wassergehalt des Darminhaltes des Karpfen beträgt bei Ernährung mit Kunstfutter 77%. Der pH-Wert liegt im Vorderdarm zwischen pH 6,5 und 7,0 und steigt in den hinteren Abschnitten des Dünndarmes auf etwa pH 8,0 an. Im Experiment wurde der Wassergehalt des Reaktionsgemisches ebenfalls auf etwa 77% eingestellt, hingegen konnte der pH-Wert aufgrund der starken Ansäuerung durch die sich lösenden Proteine trotz Verwendung eines hoch konzentrierten Puffers nicht konstant gehalten werden. Bei Verwendung von Soja als Substrat sank der pH-Wert im Verlauf des Experimentes von 7,5 auf 7,0, während der bei Casein bis auf pH 6,4 absank.

Trotz ungünstiger pH-Verhältnisse ist nach 7stündiger Inkubation 87% des Caseins zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut (Abb. 1), während das Sojaprotein nur zu 55% hydrolysiert wird

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

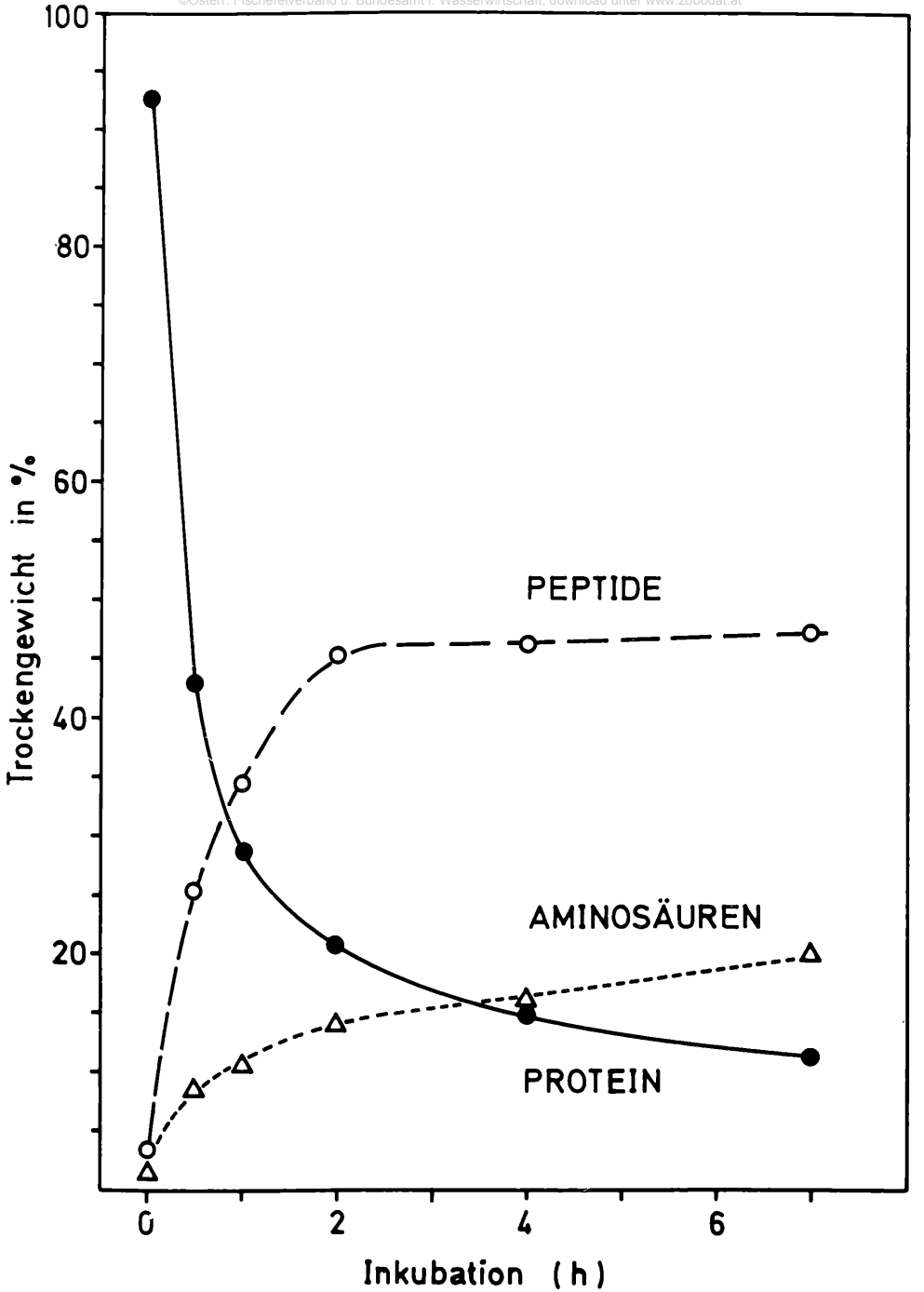


**Abb. 1:** *in vitro*-Hydrolyse von Casein durch den Verdauungssaft des Karpfen. Temperatur: 25°C, der pH-Wert sank im Laufe des Experimentes von 6,9 auf 6,4.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

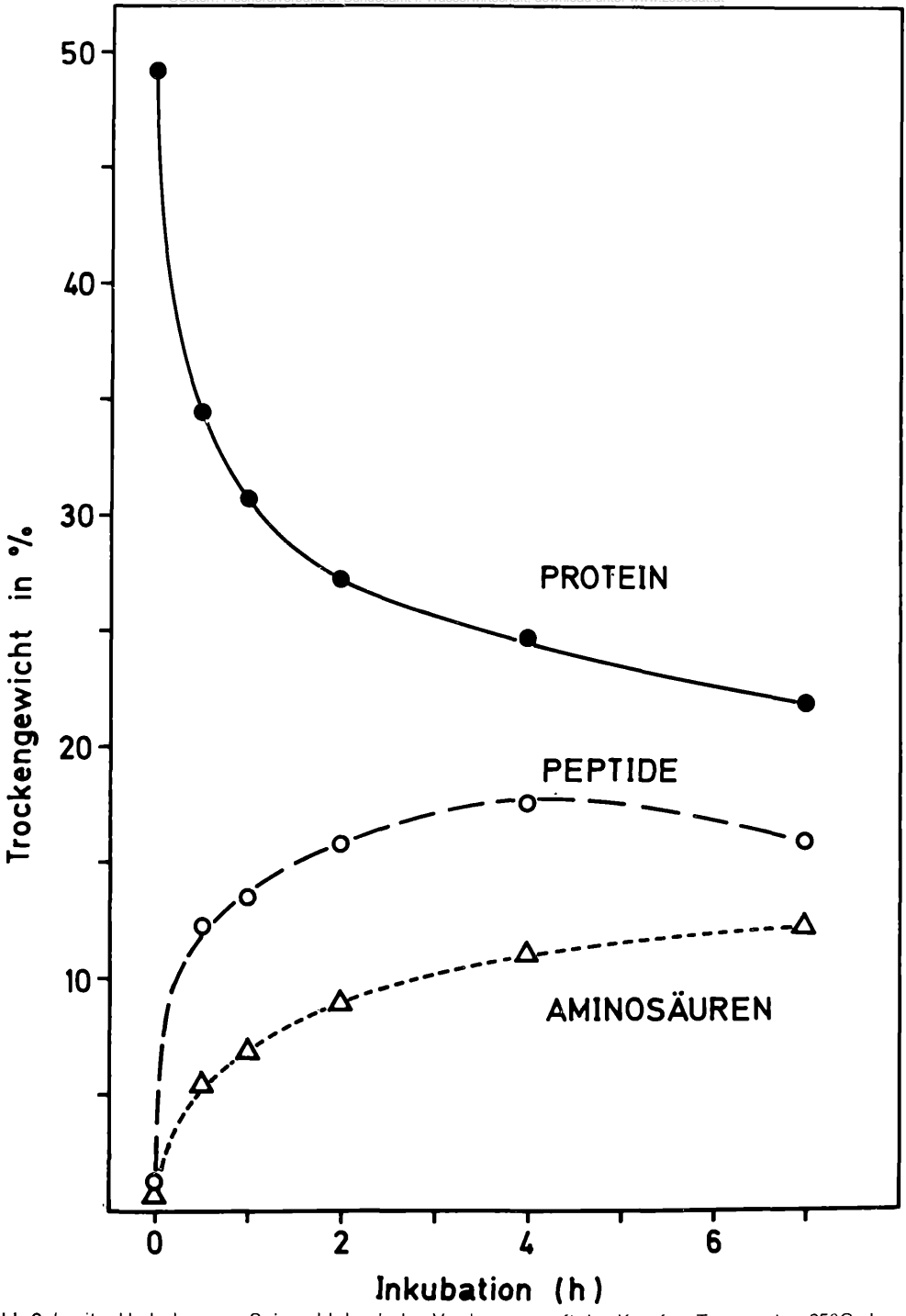


**Abb. 2:** *In vitro*-Hydrolyse von Sojamehl durch den Verdauungssaft des Karpfen. Temperatur: 25°C, der pH-Wert sank im Laufe des Experimentes von 7,5 auf 7,0.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

(Abb. 2). Aber selbst bei wesentlich günstigeren pH-Bedingungen (pH 8,0 – 7,5) wurde nicht mehr Sojaprotein abgebaut. Bei Verwendung eines anderen Sojaproduktes, das sich vom vorher erwähnten hauptsächlich durch einen nachträglichen Röstungsprozeß unterscheidet, konnte das Protein unter denselben *in-vitro*-Bedingungen nur zu 41% hydrolysiert werden (Abb. 3). Auch die Menge der anfallenden Peptide und Ninhydrin-positiven Substanzen war geringer.

Unerwartet geringe Unterschiede ergaben sich, wenn das Substrat in verschiedenen Korngrößen vorliegt (Abb. 4). Während das Sojaprotein in mehlförmigem Zustand (Korngröße 0,015 mm) zu 55% Hydrolysiert wird, liegt der Wert bei einer Körnung von 1,7 mm um 42%. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Korngrößen sind nach einer Stunde Inkubation wesentlich deutlicher als nach 7 Stunden.

Die Analyse der freien Aminosäuren im Hydrolysat nach einer Inkubaionszeit von 7 Stunden zeigt bei Verwendung von Soja als Substrat einen auffallend hohen Anteil jener Aminosäuren, deren Peptidbindungen im Proteinmolekül durch Endopeptidasen (Trypsin und Chymotrypsin) und anschließend durch Exopeptidasen hydrolysiert werden (Abb. 5). Das gesamte Tryptophan und Teile des Tyrosins sind aufgrund der Säureeinwirkung bei der Vorbehandlung zerstört worden. Unter den essentiellen Aminosäuren sind im Hydrolysat Histidin, Threonin und Methionin in nur geringer Konzentration nachweisbar. Nach 7stündiger Inkubation im Verdauungssaft des Karpfens sind aus 230mg Sojamehl 22,7mg Aminosäuren, also etwa 20% des Proteins freigesetzt worden.

*In vivo* nimmt die Proteaseaktivität in den hinteren Abschnitten des Karpfendarms stark ab und beträgt im dritten Viertel des Dünndarmes nur mehr 40 – 50%. Im *in vitro*-Versuch blieb die Aktivität bis zuletzt konstant.

## Diskussion

Die hier erhaltenen Resultate lassen sich nur sehr schwer mit *in vitro*-Versuchen aus der Literatur vergleichen, da Methoden und Versuchsbedingungen, wie eingangs schon erwähnt, wesentlich verschieden sind. Sojaprotein wird bei einer Säuger-Pepsin-Pankreatin-Behandlung zu 68% hydrolysiert (AKESON and STAHMANN 1964), während Pankreatin allein nur 34% des Sojaproteins verdaut (MENLICK 1946). Fütterungsversuche mit Forellen ergaben eine 80%ige Ausnützung des Sojaproteins (SANDHOLM et al 1976), wobei allerdings die im Wasser gesammelten Faeces analysiert wurden und dabei sicher ein erheblicher Teil der durch die Verdauungsenzyme gelösten aber nicht hydrolysierten Proteine verloren gegangen ist. Bei allen Versuchen wurden Sojapräparate mit nur geringfügiger Inhibitorkonzentration verwendet.

Der Unterschied in der Hydrolyserate zwischen Pepsin-Pankreatinbehandlung und ausschließlicher Pankreatinbehandlung ist bei Verwendung von Säugerenzymen verständlich. Die basischen Proteasen der magenlosen Cypriniden hingegen können offensichtlich einen wesentlich höheren Anteil (55%) des Sojaproteins hydrolysieren.

Casein wurde vom Verdauungssaft des Karpfens zu etwa 87% verdaut, während AKESON and STAHMANN (1964) mit Säugerenzymen einen Pepsin-Pankreatin-Index von 78% fanden.

*In vitro*-Verdauungsversuche sind erst dann als eine vollwertige Methode zur Ermittlung der Verfügbarkeit verschiedener Proteine anzusehen, wenn die direkte Übertragbarkeit auf *in vivo*-Verhältnisse anhand von parallel dazu laufenden Analysen über Nahrungsverwertung und Wachstum bestätigt wird.

Die Fähigkeit, auch Dipeptide zu resorbieren, wurde bei Säugern mehrfach nachgewiesen (WISEMANN 1968). Deshalb ist anzunehmen, daß auch Fische dazu in der Lage sind. Gerade zur Berechnung der resorbierbaren Menge essentieller Aminosäuren im Hydrolysat wäre es wichtig, das Ausmaß der Resorption kleiner Peptide, die erst in der Mucosa weiter aufgespalten werden, zu erfassen.

Trotzdem können bei *in vitro*-Experimenten allein schon aus der Hydrolyserate wichtige Erkenntnisse über die Verfügbarkeit verschiedener Proteine und über die Auswirkungen von thermischen und chemischen Vorbehandlungen auf die Verdaulichkeit gezogen werden. Berücksichtigt

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

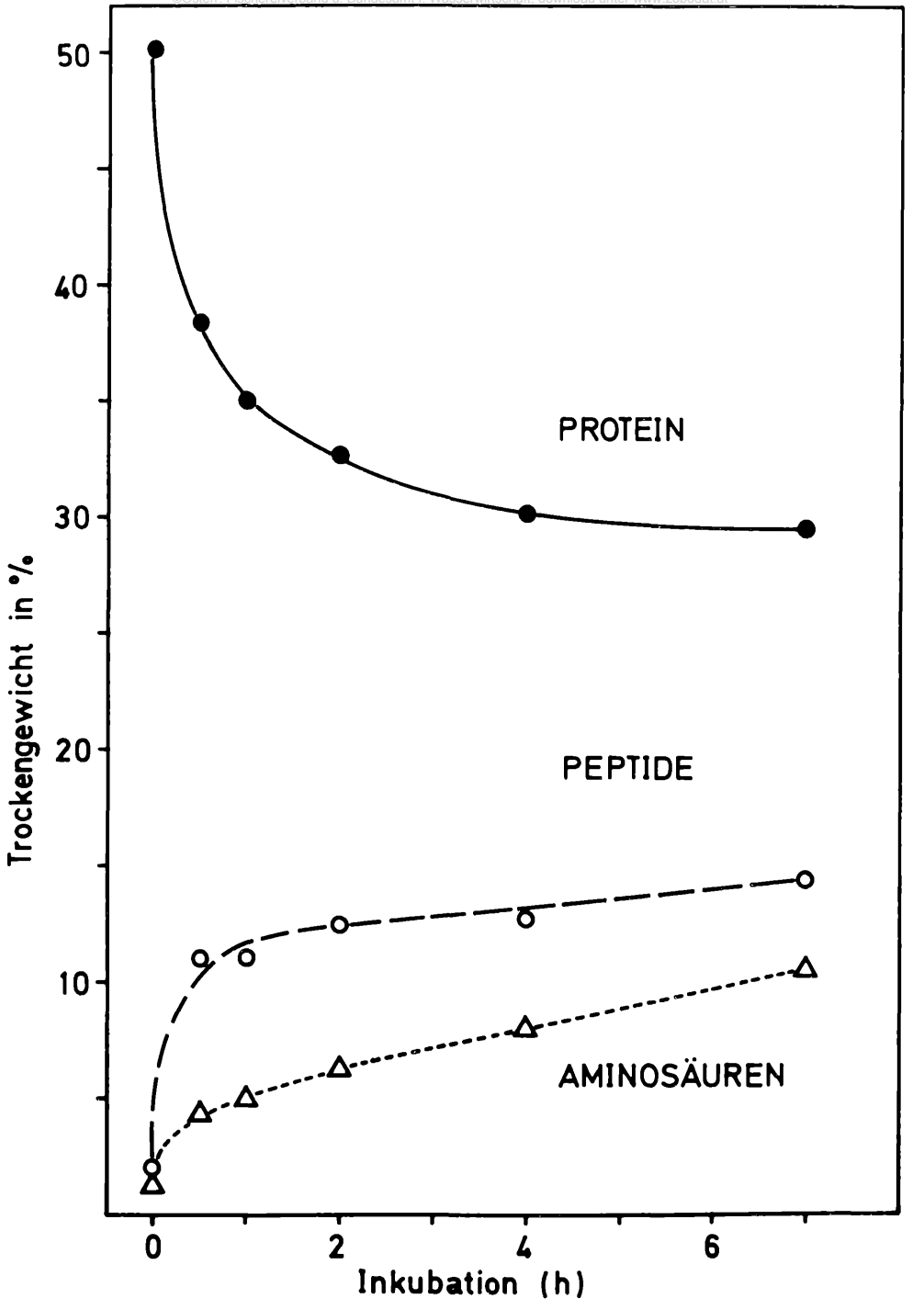


**Abb. 3:** *In vitro*-Hydrolyse von geröstetem Sojamehl durch den Verdauungssaft des Karpfen. Versuchsbedingungen wie in Abb. 2.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

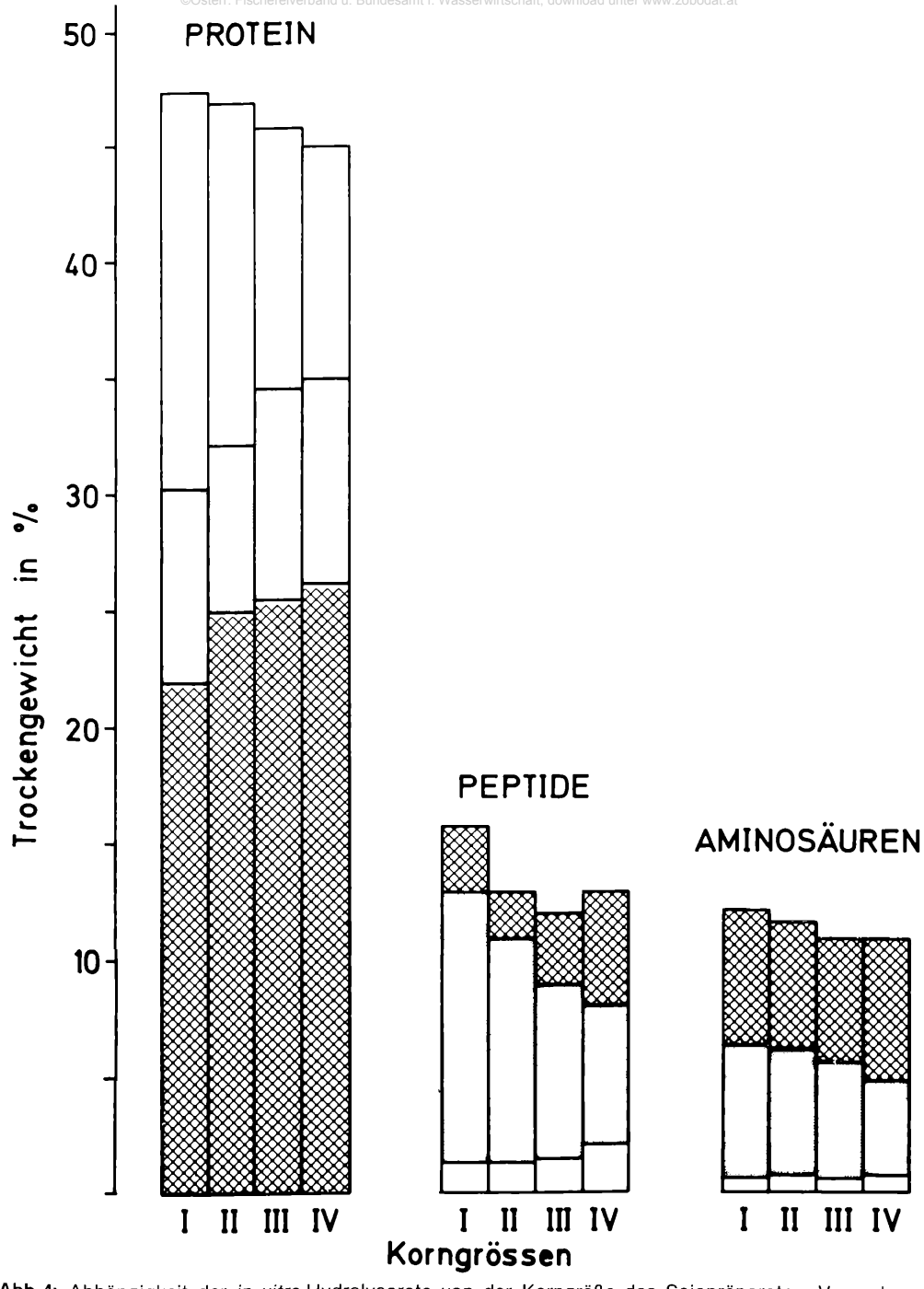


**Abb. 4:** Abhängigkeit der *in vitro*-Hydrolyserate von der Korngröße des Sojapräparates. Versuchsbedingungen wie in Abb. 2. Korngrößen: I – 0,015 mm (Mehl), II – 0,4 mm, III – 1,0 mm, IV – 1,7 mm. Inkubationszeiten: weiße Säulen: 0,0 Stunden; punktierte Säulen: 1,0 Stunde; karierte Säulen: 7,0 Stunden.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

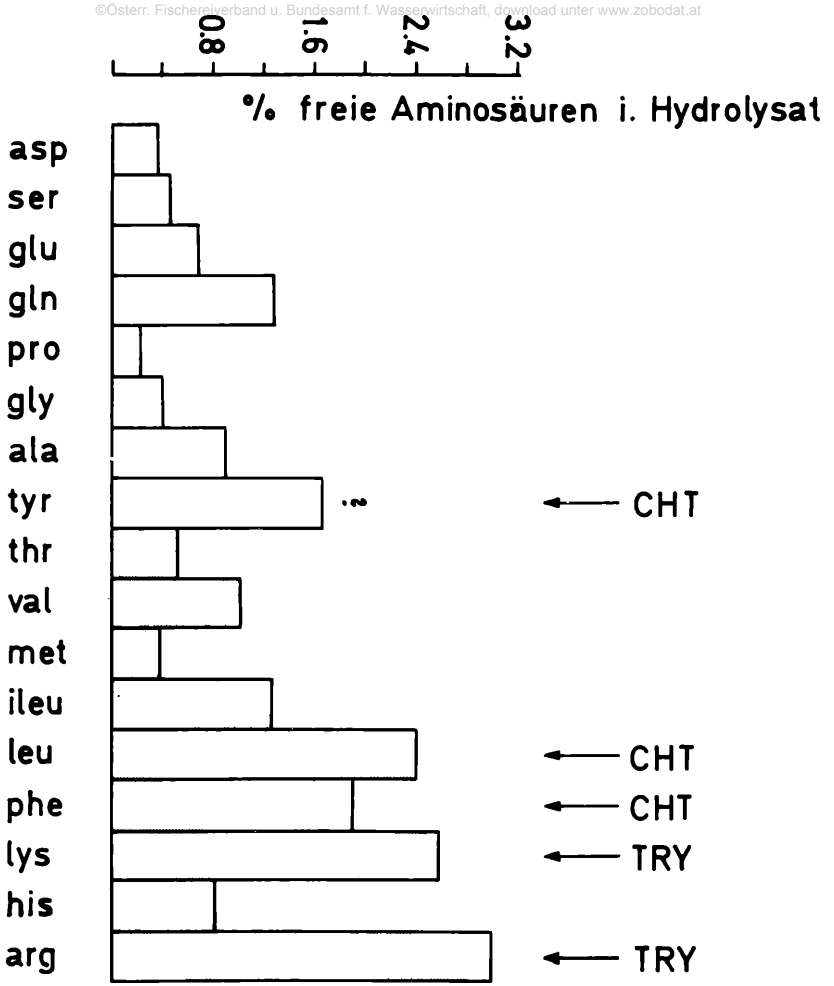


**Abb.: 5:** Freie Aminosäuren in % des eingesetzten Sojaproteins nach einer 7stündigen Inkubation mit dem Verdauungssaft des Karpfen. Versuchsbedingungen wie in Abb. 2; TRY = Trypsin, CHT = Chymotrypsin.

man nur die freien Aminosäuren im Hydrolysat, so kann man mit Hilfe von Daten über den täglichen Bedarf an essentiellen Aminosäuren zumindest überschlagmäßig berechnen, ob diese in genügender Menge freigesetzt werden. Wie eingangs schon erwähnt, sollen die *in vitro*-Verdauungsversuche vor allem dazu beitragen, aus der großen Zahl verfügbarer pflanzlicher Proteine unter geringem zeitlichem und finanziellem Aufwand jene auszuwählen, die zur Futterherstellung geeignet sein könnten.

## Zusammenfassung

*In vitro*-Verdauungsversuche gestatten einen schnellen und groben Überblick über die Verdaulichkeit verschiedener Proteine. Da die Verdauungsprozesse bei Cypriniden zum Teil sehr stark von denen der meisten übrigen Vertebraten abweichen, ist eine Übertragung der Ergebnisse von Versuchen mit Säugerenzymen auf diese wirtschaftlich bedeutende Fischfamilie nicht möglich. Deshalb wurde versucht, Casein und Soja mit dem Verdauungssaft des Karpfens zu inkubieren und die

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Hydrolyse des Proteins, sowie die Zunahme der Spaltprodukte (Peptide und Aminosäuren) zu analysieren.

Nach einer Inkubationszeit von 7 Stunden sind 87% des Caseins und 55% des von Inhibitoren weitgehendst befreiten Sojaproteins (Mehl) abgebaut. Bei Soja als Substrat sind nach 7 Stunden Inkubation etwa 20% des Proteins zu freien Aminosäuren abgebaut. Die Verteilung der einzelnen Aminosäuren im Hydrolysat wurde mit einem Aminosäurenanalysator untersucht, wobei vor allem jene Aminosäuren frei vorhanden waren, deren Peptidbindungen im Proteinmolekül durch Endopeptidasen des Verdauungssaftes gespalten werden. Einen relativ geringen Einfluß auf die Hydrolyserate hat die Korngröße; bei einer Körnung von 1,7 mm sinkt sie auf 42%. Ein geröstetes Sojapräparat wurde nur zu 41% verdaut.

LITERATUR:


ADAMS, M. W. (1974): The need for rapid assays of protein quality. J. Agr. Food Chem. 22, 556-557.

AKESON, W R. and M. A. STAHMANN (1964): A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. J. Nutrition 83, 257-261.

BENSON, J. V and J. A. PATTERSON (1971): Chromatographic advances in amino acids and peptide analysis using spherical resins and their applications in biochemistry and medicine. In: NIEDERWIESER, A. and G. PATAKI (eds): New techniques in amino acid, peptide and protein analysis. Ann. Arbor. Science Publisher, Inc., 1-73.

BLOCK, R. J. and H. H. MITCHELL (1946): The correlation of the amino acid composition of proteins with their nutritive value. Nutr. Abstr. Rev. 16, 249-278.

BUCHANAN, R. A. (1969): *In vivo* and *in vitro* methods of measuring nutritive value of leaf-protein preparations. Br. J. Nutr. 23, 533-545.

CHARNEY, J. and R. M. TOMARELLI (1947): A calorimetric method of the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J. Biol. Chem. 141, 501-505.

DOWGIAO, A. (1975): Chemical composition of an animal's body and of its food. In: GRODZINSKI, W., R. Z. KLEKOWSKI and A. DUNCAN (eds.): Methods for ecological bioenergetics. IBP Handbook No. 24, Blackw. Sci. Publ., 160-185.

ELDRED, N. R. and G. RODNEY (1946): The effects of proteolytic enzymes on raw and heated casein. J. Biol. Chem. 162, 261-265.

HOFER, R., H. LADURNER, A. GATTRINGER and W WIESER (1975): Relationship between the temperature preferenda of fishes, aphibians and reptiles, and the substrate affinities of their trypsins. J. comp. Physiol. 99, 345-355.

HOFER, R. and R. NIEDERHOLZER (1980): The feeding of roach *(Rutilus rutilus* L.) and rudd *(Scardinius erythrophthalmus* L.) II. Feeding experiments in the laboratory. Ekol. Polska 28/1 (im Druck).

MELNICK, D., B. L. OSER and S. WEISS (1946): Rate of enzymic digestion of proteins as a factor in nutrition. Science 103, 326-329.

MOORE, S. and W H. STEIN (1948): Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 176, 367-388.

RACKIS, J. J. (1974): Biological and physiological factors in soybeans. J. Am. Oil Chem. Soc. 51, 161A-174A.

SANDHOLM, M., R. R. SMITH, J. C. H. SHIH and M. L. SCOTT (1976): Determination of antitrypsin activity on agar plates: relationship between antitrypsin and biological value soybean for trout. J. Nutr. 106, 761-766.

SAUNDERS, R. M., M. A. CONNOR, A. N. BOOTH, E. M. BICKHOFF and G. O. KOHLER (1973): Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. J. Nutr. 103, 530-535.

SCHADE, R. und H. KAUSCH (1978): Untersuchungen zur Exzeßfütterung von jungen Karpfen *(Cyprinus carpio* L.) unter Intensivhaltungsbedingungen. Arch. Hydrobiol. 82, 522-550.

STEINHART, H. (1977): Contents of single amino acids in the digestion products of soybean protein after *in vitro*-digestion with pepsin. Vth Internat. Symp. Amino Acids, Budapest.

WISEMAN, G. (1968): Absorption of amino acids: In: Code, C. F. (ed.) Handbook of Physiology, sect. 6: Alimentary Canal, Vol. 3, Intestinal absorption, Am. Phys. Soc., Washington, 1277-1307.

# ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Österreichs Fischerei

Jahr/Year: 1981

Band/Volume: 34

Autor(en)/Author(s): Hofer Rudolf, Matrai Tibor

Artikel/Article: Hydrolyse von Sojaprotein durch den Verdauungssaft des Karpfens in in-vitro-Experimenten 234-242