

# DE 102006010450 A1

Anmeldeland: DE  
Anmeldenummer: 102006010450  
Anmeldedatum: 03.03.2006  
Veröffentlichungsdatum: 13.09.2007  
Hauptklasse: A23K 1/16(2006.01,A)  
Nebeklasse: A23K 1/18(2006.01,A)  
MCD-Hauptklasse: A23K 1/16(2006.01,A)  
MCD-Nebeklasse: A23K 1/18(2006.01,A)  
CPC: A23K 1/188(2013.01)  
CPC: A23K 1/1646(2013.01)  
ECLA: A23K 1/16 M  
ECLA: A23K 1/18 S  
Entgegenhaltung (NPL): Gut 1997, 41, S. 333-338  
Erfinder: Drossou, Alexandra, 24118 Kiel, DE  
Erfinder: Herzig, Karl-Heinz, Prof. Dr., Kuopio, FI  
Erfinder: Rosenthal, Harald, Prof. Dr. Dr., 21629 Neu Wulmstorf, DE  
Erfinder: Ueberschär, Bernd, Dr., 24582 Brügge, DE  
Anmelder: Leibniz-Institut für Meereswissenschaften, 24148 Kiel, DE

## **[EN]Food or feed, obtained by mixing phytohaemagglutinin and/or at least an isoform of phytohaemagglutinin-subunit, useful for the improvement of the intestinal ingestion**

### **[DE]Nahrungs- oder Futtermittel**

**[EN]**Food or feed obtained by mixing phytohaemagglutinin and/or at least an isoform of phytohaemagglutinin-subunit. Independent claims are included for: (1) a fish fodder additive, where fish fodder is a feed for fish larvae; and (2) a procedure for the production of a medicament for the increase of the cholecystokinin production and/or trypsin production using phytohaemagglutinin and/or the isoform of a phytohaemagglutinin-subunit.

**[DE]**Die Erfindung betrifft ein Nahrungs- oder Futtermittel mit einer Beimengung von Phytohaemagglutinin und/oder von wenigstens einer Isoform einer Phytohaemagglutinin-Untereinheit, insbesondere die Verwendung von Phytohaemagglutinin als Fischfutterzusatz in kommerziellen Brutfuttern zur Unterstützung der Reifung des Verdauungstraktes und damit zur Steigerung der larvalen Verdauungseffizienz. Des Weiteren betrifft sie die Verwendung von Phytohaemagglutinin zur Einsparung von Lebendfutter in der Fischzucht.

---

Seite 1 --- ()

Seite 2 --- ()

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Nahrungs- oder Futtermittel, insbesondere einen Fischfuttermittelzusatz. Von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Aufzucht von Fischlarven ist das Nahrungsangebot und die Nahrungsaufnahme während der ersten Lebensstadien.

**[0002]** Trotz der enormen Fortschritte der Forschung zur Herstellung geeigneter Futtermittel gibt es immer noch für die Zucht wichtige Fischarten, für deren frühe Larvenstadien ohne lebendes Zooplankton als Startfutter entweder keine Aufzuchtmöglichkeit besteht oder bei Verabreichung hergestellter Futter mit hohen Mortalitätsraten und Wachstumseinbußen zu rechnen ist.

**[0003]** Die Herstellung von Trockenfuttermitteln, welche lebende Futtertiere von der ersten exogenen Nahrungsaufnahme an ersetzen können, ist nicht nur wegen der hohen Kosten, die mit der Aufzucht des Lebendfutters verbunden sind wichtig, sondern auch wegen des Zieles, ein ausgewogenes gleich bleibendes Futter jederzeit anbieten zu können, und damit das Risiko von Fehlschlägen beim Aufbau von Nahrungsketten zur Larvenfütterung zu minimieren. Dabei sind etwa 60% der gesamten Kosten einer Brutanlage sind auf die Bereitstellung der lebenden Futterorganismen zurückzuführen, was die wirtschaftliche Notwendigkeit der Entwicklung eines effizienten Ersatzfutters erklärt.

**[0004]** Im Vergleich zu juvenilen und adulten Fischen verfügen Fischlarven nach dem Schlupf über einen noch sehr einfach organisierten Verdauungstrakt und ernähren sich aufgrund ihres hohen Proteinbedarfes überwiegend carnivor. Für die Proteinverdauung im Jugendstadium kommen aufgrund des fehlenden funktionstüchtigen Magens nur die alkalischen Proteasen in Frage. Darunter spielt die Aktivität der alkalischen Protease Trypsin eine Schlüsselrolle.

**[0005]** Trypsin gehört zur Gruppe der Serinproteasen und nimmt eine wichtige Stellung unter den proteolytischen Enzymen ein. Trypsin wird vom Pankreas als die inaktive Vorstufe Trypsinogen sezerniert und das Enzym Enteropeptidase aktiviert. Darüber hinaus wird Trypsinogen autokatalytisch auch durch Trypsin selber aktiviert. Der Bildungsort von Trypsinogen sind die Azinuszellen, in denen die Proteine in membranumhüllten Granula gespeichert werden. Sie sammeln sich in den Azinuszellen und werden bei Stimulation dieser Zellen durch ein Hormonsignal oder einen Nervenimpuls in das Duodenum sezerniert.

**[0006]** Die Stimulation der Trypsinproduktion wird bei ausgewachsenen Fischen durch das Hormon Cholecystokinin bewirkt. Cholecystokinin (CCK) ist ein gastorintestinales Hormon, das eine physiologische Rolle bei der Regulierung der Nahrungsaufnahme spielt. Dem CCK wird eine Reihe von Funktionen zugeschrieben, wie Aktivierung der Gallenblasenkontraktion, Hemmung des Chymusaustrittes aus dem Magen, Stimulierung der pankreatischen Enzymsekretion. Nach einer Mahlzeit erhöht sich die CCK-Konzentration im Plasma. Beim Durchlauf der Nahrung durch den Verdauungstrakt werden gastrointestinale Peptide von Magen und Darm sezerniert, welche die Pankreasenzymsekretion auslösen. Andererseits löst Trypsin ein negatives Feedback-Signal aus, um die Freisetzung von CCK zu unterbrechen.

**[0007]** Es ist die Aufgabe der Erfindung, die intestinale Nahrungsaufnahme zu verbessern, möglichst dabei Mortalität von Jungorganismen zu verringern und dies bevorzugt mittels eines Nahrungs- oder Futtermittels, welche es ermöglicht, die Verdauungsentwicklung von &ndash; insbesondere marinen &ndash; Fischlarven zu steigern und die Einsparung von Lebendfutter in der Fischzucht ermöglicht.

**[0008]** Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Hauptanspruches. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausführungen wieder.

**[0009]** Das erfindungsgemäße Nahrungs- oder Futtermittel weist eine Beimengung von Phytohaemagglutinin und/oder von wenigstens einer Isoform einer Phytohaemagglutinin-Untereinheit auf. Bevorzugt wird vorgeschlagen, einen Fischfutterzusatz in einem Fischfuttermittel mit einer Isoform

ausgewählt aus der Gruppe E4, E3L, E2L2, EL3 und L4 einzusetzen. Dabei kann aber eine erfindungsgemäße Beimengung auch die intestinale Nahrungsaufnahme auch anderer Organismen positiv beeinflussen.

**[0010]** Das Fischfutter kann Trockenfutter sein und als Futtermittel für Fischlarven eingesetzt werden, insbesondere um die larvalen Mortalität bei Fischen zu verringern.

**[0011]** Allgemein kann Phytohaemagglutinin zur Steigerung der Cholecystokinproduktion und/oder Trypsinproduktion verwandt werden, wobei insbesondere ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Steigerung der Cholecystokinproduktion und/oder Trypsinproduktion unter Verwendung von Phytohaemagglutinin und/oder von wenigstens einer Isoform einer Phytohaemagglutinin-Untereinheit vorgeschlagen wird.

**[0012]** Mit der ersten exogenen Nahrungsaufnahme tritt bei Fischlarven eine Phase ein, die in Bezug zu den Überlebensraten &ndash; insbesondere mariner Larven &ndash; auch als &ldquo;kritische Phase" bezeichnet wird, da während dieser Periode die höchsten Mortalitätsraten im

### Seite 3 --- ()

Larvenstadium beobachtet werden. Die Ursachen liegen vermutlich in den für die Umstellung auf exogene Nahrung notwendigen Änderungen im Metabolismus (enormer Energieaufwand). Es konnte gezeigt werden, dass mit Beginn der &ldquo;kritischen Larvalphase" eine Abnahme der Trypsinaktivität auftritt.

**[0013]** Es hat sich weiter gezeigt, dass die Trypsinaktivität während der ersten Larvenstadien ein Defizit darstellt und, dass eine Manipulation bzw. Erhöhung der CCK-Konzentration durch den Einsatz von Phytohaemagglutinin, dieses Defizit kompensieren kann. Hier konnte erstmalig eine Interaktion zwischen der Trypsinaktivität und der CCK-Konzentration bei Fischlarven gezeigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Zusatz von Phytohaemagglutinin (einschließlich seiner Untereinheiten) zum Fischfutter eine Steigerung der CCK-Konzentration von Fischlarven erzielt.

**[0014]** Zur gezielten Stimulation der CCK-Ausschüttung wurde die tägliche Trockenfuttermenge der Larven mit mindestens 0,05% Phytohaemagglutinin angereichert. Die behandelten Fischlarven zeigten Wachstums- und Überlebensraten vergleichbar mit denen von Larven, die Lebendfutter bekommen haben. Die Anreicherung des Brutfutters führt zu einer Stimulierung der CCK-Ausschüttung, und zu konstanten Trypsinaktivitäten und steigert so die Verdauungseffizienz von Fischlarven.

**[0015]** Phytohaemagglutinin ist ein Lectin-Extrakt aus roten Bohnen (*Vaseolus vulgaris*): alle Lectine enthalten zwei oder mehr Bindungsstellen für Kohlenhydrateinheiten, die für die Agglutination von Erythrozyten und anderen Zellen verantwortlich sind. PHA beinhaltet eine Familie von 5 Isolectinen (jedes Isolectin ist ein Tetramer, das von nicht-kovalenten Kräften zusammengehalten wird). Jedes Isolectin besteht aus 4 Untereinheiten (diese Untereinheiten kann man in zwei verschiedene Typen unterteilen: leucozyten-reaktive (L) und erythrozyten-reaktive (E)), in 5 möglichen Formen: E4, E3L, E2L2, EL3, L4. PHA-P ist die Proteinform von PHA, vor der Reinigung bzw. Trennung von Leucoagglutinin und Erythroagglutinin. Zur Vermeidung toxischer Nebenwirkungen, ist die Dosis sowie der Reinigungsgrad (Kombination der auftretenden Untereinheiten) ggf. durch eine kurze Versuchsreihe an die Fütterungsparameter anzupassen.

Ausführungsbeispiel

**[0016]** Larven von *Oreochromis niloticus* wurden während des letzten Stadiums der Dottersackphase in die für die Experimente vorgesehene Anlage eingesetzt, eine Hälterungsanlage.

**[0017]** Zur Aufzucht der Larven wurde ein Süßwasserdurchflußsystem aufgebaut. Während der gesamten Versuchszeit wurden konstante Raumtemperatur ( $26 \pm 1,4^\circ\text{C}$  liegt im Optimalbereich dieser Fischart) und Lichtverhältnisse (12 h/Tag Beleuchtungsdauer, mit einer Lichtintensität von 1400 Lux, gemessen an der Wasseroberfläche) gewährleistet.

**[0018]** Die Anlage bestand aus hellgrauen, quaderförmigen Hälterungsbecken (ca. 184 dm<sup>3</sup> Gesamtvolumen) aus Kunststoff (HDPE, Polyethylen hoher Dichte). Als Hochtank diente ein kleineres, gleichförmiges HDPE-Becken (ca. 67 dm<sup>3</sup> Gesamtvolumen). Die Auslaufrohre (PVC, Polyvinylchlorid) befanden sich bei den Hälterungsbecken 21 cm, beim Hochtank 9 cm über dem Beckenboden, so daß das Wasservolumen der gefüllten Becken ca. 94 dm<sup>3</sup> bzw. 49 dm<sup>3</sup> betrug. Um ein Entkommen der Larven zu verhindern, war die Ablauföffnung mit Gaze (335 &mgr;m Porenweite) bespannt. Das Wasser wurde im Hochtank vorgeheizt und über individuell regulierbare Zuläufe (Klemmen an den Zulaufschläuchen) den Larvenbecken dicht über der Wasseroberfläche zugeleitet. In jedem Becken wurde ein Belüfterstein (Kieselgurströmer, 5 x 2,5 cm), der durch einen Schlauch an die zentrale Luftversorgung des Hauses angeschlossen war, auf schwache Belüftung eingestellt. Die Beleuchtung erfolgte durch zwei parallel zueinander angeordnete Leuchtstoffröhren, die ca. 50 cm über der Wasseroberfläche angebracht waren und sich über alle drei Versuchsbecken erstreckten. Der Wasserdurchfluß war in allen Becken gleich eingestellt und betrug 0,3 dm<sup>3</sup>/Min.

**[0019]** Die stündliche Wassererneuerungsrate betrug somit 19% des jeweiligen Beckenvolumens (94 dm<sup>3</sup>).

Experimentelle Gruppen

**[0020]** Die Verteilung der Larven auf die einzelnen Becken erfolgte so, daß die Brut unterschiedlicher Elterntiere nicht untereinander vermischt wurde. Drei Gruppen wurden miteinander verglichen: Larven, die mit lebendem Zooplankton (*Artemia*), Trockenbrutfutter (kommerzielles Forellenbrutfutter), oder Trockenbrutfutter angereichert mit PHA gefüttert wurden.

**[0021]** Die Fütterung begann am Morgen nach der Besetzung der Hälterungsbecken. In dieser Arbeit wurden die *Artemia*-Nauplien (Lebendfutter) zweimal (10:30, 16:30), die Trockenfuttermittel dreimal täglich verabreicht (10:30, 14:30, 16:30), so daß alle Futtermittel ad libitum zur Verfügung standen.

Futter

**[0022]** Als Lebendfutter dienten Nauplien von *Artemia salina*. Die Erbrütung des Lebendfutters erfolgte in zwei Imhoff-Glastrichtern (1 dm<sup>3</sup> Wasservolumen); die Einstellungen der abiotischen Faktoren, sowie die abgewogene Menge an Cysten entsprachen den An

### Seite 4 --- ()

gaben des Herstellers für maximale Ausbeute. Pro Glastrichter wurde alle zwei Tage ein neuer Brutansatz gestartet.

**[0023]** Um einen kontinuierlichen Nachschub zu gewährleisten, wurden die zwei Trichter jeweils um 1 Tag versetzt befüllt. Nach 48 Stunden wurden die Nauplien in kaltem Nordseewasser bei guter Durchlüftung bis zur Fütterung (maximal 6 Stunden) gehältert. Der Inhalt eines Erbrütungsbehälters wurde innerhalb eines Tages verfüttert. Dies entsprach 3 Nauplien pro ml Beckenvolumen.

**[0024]** An die mit Trockenfutter ernährten Larvengruppen wurde täglich 10% ihres Gewichtes verfüttert. Als Trockenfutter wurde Forellenbrutfutter (Trouvit pro aqua® Brut 000, MILKIVIT, TROUW NUTRITION DEUTSCHLAND GMBH, Burgheim) in Form von Granulat mit einer Korngröße von 0,4&ndash;0,6 mm eingesetzt.

**[0025]** Zur Berechnung der täglichen Rationen wurde in regelmäßigen Abständen das mittlere Naßgewicht von 10&ndash;20 Larven mit Hilfe einer Feinwaage (Sartorius, Genauigkeit bei 0&ndash;42g: 5 Stellen nach dem Komma) ermittelt. 10% dieses Mittelwertes multipliziert mit der verbliebenen Anzahl an Larven im jeweiligen Becken, ergab die abzuwiegende Futtermenge pro Tag.

**[0026]** Für die Gruppe mit dem angereicherten Trockenfutter, wurde das Forellenbrutfutter mit salzfreiem Phytohaemagglutinin PHA-P (SIGMA-ALDRICH, Art. Nr. L-8754, lyophilisiert) vermischt. Die Verabreichung des Lectins (0,004 g/d PHA-P) erfolgte nur bei der ersten Tagesfütterung

(10:30). Forellenbrutfutter und PHA-P wurden dazu in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf der Feinwaage abgewogen und auf dem Schüttler (Vortex) gründlich durchmischt.

Probenahme und Bearbeitung

**[0027]** Die Probenahme erfolgte stets morgens vor der ersten Fütterung. Von jeder Futtergruppe wurden täglich mit einer Glaspipette 20 Larven zusammen mit etwas Beckenwasser in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, wobei die maximale Anzahl pro Reaktionsgefäß 10 Larven betrug. Die Larven wurden sofort bei  $-70^{\circ}\text{C}$  schockgefroren, um eine enzymatische Aktivität bzw. Veränderung zu unterbinden. An jedem Meßtag wurde die zur Aufarbeitung bestimmte Anzahl an Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die mit Larven gefüllt waren, aus der Tiefkühltruhe in eine mit Eis gefüllte Plastikwanne gelegt und so bei ca.  $0^{\circ}\text{C}$  langsam zum Auftauen gebracht. Die einzelnen Larven wurden mit destilliertem Wasser gespült.

**[0028]** Ein Binokular (WILD, M5A, 141499) diente zur Überprüfung der Vollständigkeit des Darmtraktes, sowie zur Bestimmung der Totallänge (TL) mit Hilfe eines eingebauten Meßokulars (sechsfache Vergrößerung: 25 Teilstriche = 4 mm). Anschließend wurde jede Larve in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500  $\mu\text{l}$  TRIS-HCL-Puffer (0,1 Molar, pH 8,00) homogenisiert. Der 0,1 molare Puffer wurde mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , MERCK, Art. Nr. 8382), Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , MERCK, Art. Nr. 2382) und deionisiertem Wasser angesetzt. Die Einstellung auf den gewünschten pH-Wert erfolgte mit 32%iger Salzsäure. Die Homogenisierung erfolgte bei den Proben aus dem ersten Versuch mit einem Mikropistill für Eppendorf-Reaktionsgefäße. Für die Proben aus dem zweiten Versuch wurde am hinteren Ende des Mikropistills ein batteriebetriebener Motor (Pellet Pestle® Motor, KONTES GLASS COMPANY) angebracht, der die Homogenisierungszeit wesentlich verkürzte. Die Reaktionsgefäße mit den "Rohhomogenaten" wurden dann in einer Kühlzentrifuge (Minifuge T, HERAKEUS) bei  $-2^{\circ}\text{C}$  und einer Drehzahl von 6000/Min. eine Stunde lang zentrifugiert.

Chemische Analyse

**[0029]** Die Messung der Trypsinaktivität erfolgte fluoreszenzphotometrisch. Durch den Einsatz eines für dieses Enzym hochspezifischen Substrates, das an ein fluoreszierendes Molekül gekoppelt ist, konnte die katalytische Aktivität des Enzyms als Anstieg der Fluoreszenz pro Zeiteinheit gezielt bestimmt werden. Dieser ist proportional zur Trypsinmenge im Homogenat. Als synthetisches Substrat diente Na-benzoyl-L-arginin-4-methylcoumarinyl-7-amid (Z-Arg-MCA  $\times$  HCl, BACHEM, I-1130, Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Es handelt sich hier um ein synthetisches Amid, das an dem Fluoreszenzchromophoren 4-methylcoumarinyl-7-amid gekoppelt ist und vom Trypsin am Arginin spezifisch gespalten wird.

**[0030]** Bei der zur Messung der CCK-Konzentration angewendeten Methode handelt es sich um ein Bioassaysystem zur Erfassung biologisch aktiver Formen von Cholecystokinin (CCK). Das Prinzip der Messung basiert auf der sekretionsauslösenden Eigenschaft von CCK auf isolierte Azinuszellen. Aus dem Rattenpankreas gewonnene Azini sezernieren in Abhängigkeit von der CCK-Konzentration Amylase. Indem die Spezifität dieses Enzyms zu einem synthetischen Substrat genutzt wird, kann seine katalytische Aktivität gemessen werden. Als synthetisches Substrat wird 5-Ethyliden-(G<sub>7</sub>)-PNP (PNP = p-Nitrophenol, G = Glucose) verwendet. Die quantitative Bestimmung der Amylase erfolgte photometrisch mittels eines Kit-Tests (Amyl, ROCHE).

Ergebnisse

**[0031]** Es konnte erstmalig eine Interaktion zwischen der Trypsinaktivität und der CCK-Konzentration bei Fischlarven gezeigt werden. Durch den Zusatz

## Seite 5 --- ()

von Phytohaemagglutinin (einschließlich seiner Untereinheiten) zum Fischfutter, konnte eine Steigerung der CCK-Konzentration und konstante Trypsinaktivitäten von Fischlarven erzielt werden. Der Auftritt von negativen Effekten von PHA konnte in Bezug auf Wachstum, Überlebensraten und Trypsinogenaktivierung ausgeschlossen werden. Vergleichbares Längen- und Gewichtswachstum zwischen allen untersuchten Gruppen.

**[1]** Nahrungs- oder Futtermittel, gekennzeichnet durch eine Beimengung von Phytohaemagglutinin und/oder von wenigstens einer Isoform einer Phytohaemagglutinin-Untereinheit.

**[2]** Fischfutterzusatz in einem Fischfuttermittel nach Anspruch 0, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Isoform ausgewählt ist aus der Gruppe E4, E3L, E2L2, EL3 und L4.

**[3]** Fischfutterzusatz nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Fischfutter Trockenfutter ist.

**[4]** Fischfutterzusatz nach einem der vorhergehenden Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Fischfutter ein Futtermittel für Fischlarven ist.

**[5]** Verwendung eines Futtermittels nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Verringerung der larvalen Mortalität bei Fischen.

**[6]** Verwendung eines Nahrungs- oder Futtermittels nach einem der Ansprüche 0 bis 0 zur Verbesserung der intestinalen Nahrungsaufnahme.

**[7]** Verwendung von Phytohaemagglutinin zur Steigerung der Cholecystokininproduktion und/oder Trypsinproduktion.

**[8]** Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Steigerung der Cholecystokininproduktion und/oder Trypsinproduktion unter Verwendung von Phytohaemagglutinin und/oder von wenigstens einer Isoform einer Phytohaemagglutinin-Untereinheit.