

Untersuchung zur Simulation
einer zäkalen Azidose beim Pferd
durch Raftilosefütterung mittels Caesitec

von Wiebke Buza geb. Engelmann

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Untersuchung zur Simulation
einer zäkalen Azidose beim Pferd
durch Raftilosefütterung mittels Caesitec

von Wiebke Buza geb. Engelmann
aus Bernburg

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Angefertigt am: Institut für Tierernährung, Diätetik und Ernährungsschäden der
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
Mentor: Prof. Dr. Annette Zeyner

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatterin: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Allen AkademikerInnen
Zwischen
Zweksamkeit und Zeitzwängen,
Kind und Kegel,
Freunden und Freizeit,
Dienst und Dissertation.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1.	Kohlenhydrate in Futtermitteln von Pferden.....	2
2.1.1.	Einteilung und Bedeutung von Kohlenhydraten.....	2
2.1.2.	Wichtige Kohlenhydrate in Futtermitteln von Pferden.....	2
2.2.	Kohlenhydratverdauung beim Pferd.....	6
2.2.1.	Enzymatische Aufspaltung.....	7
2.2.2.	Physiologische Mikroflora des equiden Verdauungskanal.....	8
2.2.3	Fermentation von Kohlenhydraten im equinen Dickdarm.....	10
2.3.	Dysbiose.....	13
2.3.1	Ursachen von Dysbiosen.....	13
2.3.2	Folgen von Dysbiosen.....	14
2.3.2.1.	Enterale Effekte.....	14
2.3.2.1.1.	Milieuveränderungen.....	15
2.3.2.1.2.	Aufgasung und Kolik.....	15
2.3.2.2.	Extraenterale Effekte.....	15
2.3.2.2.1.	Hufrehe.....	16
2.4.	Untersuchungsmethoden.....	20
2.4.1.	in vivo-Systeme.....	21
2.4.2.	in situ-Systeme.....	21
2.4.3.	Gasvolumenmessung.....	22
2.4.4.	in vitro-Systeme.....	23
2.4.4.1.	mikrobielle Systeme.....	23
2.4.4.2.	enzymatische Systeme.....	23
2.4.4.3.	RuSiTec, CoSiTec, CaeSiTec.....	23
2.5.	Zusammenfassung.....	25
2.6.	Hypothese.....	26
2.7.	Zielstellung.....	26
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1.	Versuchsaufbau.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.1.1.	Versuchsdesign.....	27
3.1.2.	Versuchstiere.....	28
3.1.3.	Substrate.....	29
3.1.3.1.	Heu.....	29
3.1.3.2.	Raftilose - BoneoTM P95.....	30
3.1.4.	Geräte.....	31
3.1.5.	Aufbau.....	31
3.1.5.1.	Caesitec (Caecum Simulation Technik).....	31
3.1.5.2.	HGT (Hohenheimer Gasbildungstest).....	32
3.1.6.	Chemikalien.....	32
3.2.	Versuchsdurchführung.....	32
3.2.1.	Ablauf Caesitec.....	32
3.2.2.	Ablauf Hohenheimer Gasbildungstest (HGT).....	34
3.3.	Proben und Analysen.....	35
3.3.1.	Probennahme und Probenaufbereitung.....	35
3.3.1.1.	Caesitec.....	36
3.3.1.2.	HGT.....	36
3.3.2.	Analytische Methoden.....	37
3.3.2.1.	Trockensubstanz und Rohnährstoffgehalt.....	37
3.3.2.2.	Bestimmung der Titrationsazidität.....	39
3.3.2.3.	pH-Wert-Bestimmung.....	39
3.3.2.4.	Redoxpotential.....	39
3.3.2.5.	Pufferüberlauf.....	39
3.3.2.6.	Fettsäurezusammensetzung.....	39
3.3.2.7.	D- und L-Laktat.....	40
3.3.2.8.	Ammoniak.....	41
3.3.2.9.	Mikrobiologie und Endotoxine.....	41
3.3.2.10.	Gasvolumen.....	41
3.3.2.11.	Gaszusammensetzung.....	42
3.3.3.	Statistische Auswertung.....	43
IV.	ERGEBNISSE.....	44
4.1.	Inokulumzusammensetzung.....	52
4.2.	Parameter der Inkubationsflüssigkeit.....	53

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.	Titrationssazidität.....	53
4.2.2.	Redoxpotential.....	53
4.2.3.	pH-Wert.....	54
4.2.4.	kurzkettige Fettsäuren (FFS).....	56
4.2.5.	D- und L-Laktat.....	61
4.2.6.	Ammoniak.....	63
4.2.7.	Mikrobiologie und Endotoxine.....	64
4.3.	Fermentative Gasbildung.....	66
4.3.1.	Gasvolumen.....	66
4.3.2.	Gaszusammensetzung.....	70
4.3.3.	Wasserstoffkonzentration (H ₂).....	70
4.3.4.	Methankonzentration (CH ₄).....	71
4.3.5.	Wasserstoff-Methan-Quotient (H ₂ :CH ₄).....	72
V.	DISKUSSION.....	74
5.1.	Kritik der Methode.....	74
5.1.1.	Raftilose als Modell für natürliche Grasfruktane.....	74
5.1.2.	Spendertiere.....	76
5.1.3.	Versuchsdesign.....	77
5.1.4.	Methode zum Nachweis von Endotoxinen.....	77
5.1.5.	Übertragbarkeit der Ergebnisse der in vitro-Methode Caesitec auf in situ-Bedingungen im equinen Zäkum.....	78
5.2.	Erörterung der eigenen Ergebnisse.....	79
5.2.1.	Einfluss der einmaligen Raftilosegabe auf die Fermentation in vitro (Caesitec)	79
5.2.2.	Einfluss der Korrektur zur Ausgangsration und einer wiederholten Raftilosegabe auf die Fermentation in vitro (Caesitec).....	87
5.2.3.	Vergleich der Caesitec-Ergebnisse mit HGT-Studie.....	90
5.3.	Schlussbetrachtung.....	93
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
VII.	SUMMARY.....	97
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	99
IX.	ANHANG.....	127

Inhaltsverzeichnis

X. DANKSAGUNG.....173

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen des internationalen Einheitensystems und Symbolen der chemischen Elemente wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
ADF	saure Detergentienfaser
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
c	Konzentration
Ca	Kalzium
ca.	zirka
Caesitec	Caecum Simulation Technique
Cu	Kupfer
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
EU	Endotoxinunit 1 EU/ml ~ 100 pg/ml
FW	molare Masse
g	Gramm
h	Stunde
HGT	Hohenheimer Gasbildungstest
I.E.	Internationale Einheit
J	Joule
K	Kalium
kg	Kilogramm
KZ	Keimzahl
l	Liter
LM	Lebendmasse
max.	maximal
Mg	Magnesium
min.	minimal
mk	männlich kastriert
min	Minute/n
mM	Millimolar
ml	Milliliter
µm	Mikrometer

Abkürzungsverzeichnis

Na	Natrium
NfE	Stickstofffreie Extraktstoffe
NDF	neutrale Detergentienfaser
N	Stickstoff
OS	Originalsubstanz
P	Phosphor
Ra	Rohasche
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
Rpm	Rotation pro Minute
Rpr	Rohprotein
Tab.	Tabelle
TS	Trockensubstanz
u.a.	unter anderem
uS	ursprüngliche Substanz
u.v.a	und viele andere
v.a.	vor allem
vs	versus
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

Einleitung

I EINLEITUNG

Das Pferd ist als herbivorer Steppenbewohner mit seinem Verdauungskanal an eine kontinuierliche Futteraufnahme (10 - 17 h täglich) rohfaserreicher Rationen adaptiert. Langes Kauen und Einspeicheln, präzäkale Verwertung von leichtverdaulichen Kohlenhydraten und die Fermentation schwerverdaulicher Bestandteile in den Gärkammern des Dickdarms sind die Voraussetzung für eine ungestörte Darmfunktion. In der modernen Pferdehaltung wird der equine Darm jedoch durch energiereiche Rationen oder jahreszeitliche Schwankungen der Zusammensetzung des Weidegrases mit großen Mengen kohlenhydratreicher Futtermittel konfrontiert. Bei der Anflutung präzäkal unverdauter, leicht fermentierbarer Zucker in den Dickdarm kommt es zur Beeinflussung der Mikroflora des Darmtraktes. Ein bakterielles Ungleichgewicht kann zur Dysfunktion des gesamten Verdauungsapparates führen. In Fütterungsstudien wurden durch hohe Gaben von stärkereichen Futtermitteln (GARNER 1977) oder Fruktanen, als Vertreter rasch fermentierbarer Kohlenhydrate in Gräsern (FRENCH und POLLITT 2004a, MILINOVICH et al. 2006 und 2007), Dysbiosen mit Fehlgärungen ausgelöst. In deren Zusammenhang werden Folgen wie Mukosazerstörung und Toxinausschwemmung sowie die Entstehung von Hufrehe (Laminitis) diskutiert.

Jedoch ist die Kaskade von pH-Wert-Änderung über mikrobielle Speziesverschiebung sowie Veränderungen der Fermentationsdynamik und des Metabolitprofil während einer Dysbiose noch nicht endgültig geklärt. Zur näheren Untersuchung eignen sich besonders in vitro-Systeme, die eine praxisnahe Simulation der Verdauungsvorgänge über einen längeren Zeitraum zulassen und Tierversuche so ersetzen können.

In der vorliegenden Arbeit wird unter Verwendung des in vitro-Systems „Caesitec“ (Caecum Simulation Technique) der Einfluss von Raftilose, als Vertreter der Fruktane, auf die Fermentation und Mikroflora des equinen Zäkums untersucht. Anschließend erfolgt ein Vergleich mit dem Hohenheimer Gasbildungstest.

II LITERATURÜBERSICHT

Dieser Teil der Arbeit zeigt einen Überblick über den derzeitigen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse im Bereich der Simulation von ernährungsbedingten Azidosen beim Pferd.

2.1 Kohlenhydrate in Futtermitteln von Pferden

In der Ernährung von Herbivoren stellen Kohlenhydrate eine Hauptenergiequelle dar (BONHOMME-FLORENTIN 1988, HOFFMAN et al. 2001). Im equinen Verdauungskanal werden sie teilweise im Magen und Dünndarm verdaut oder während ihrer Passage durch die Dickdarmabteilungen fermentiert (HINTZ et al. 1971). Ihre chemische Zusammensetzung und Struktur sind entscheidend für die Abbaubarkeit durch körpereigene Enzyme sowie die jeweiligen Fermentationseigenschaften.

2.1.1 Einteilung und Bedeutung von Kohlenhydraten

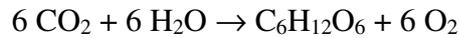
Kohlenhydrate (Saccharide, Zucker) sind organische Verbindungen aus Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff, die nach ihrer chemischen Struktur in Einfach- (Mono-), Zweifach- (Di-) und Mehrfachzucker unterteilt werden. Mehrfachzucker gliedern sich nochmals in Oligo- (zyklisch, nicht zyklisch, bis 8 Zuckermoleküle) und Polysaccharide (über 8 Moleküle). Zucker werden über glykosidische Bindung von Monosacchariden verkettet (1-4 oder 1-6, α - oder β - glykosidisch). Beispiele für die verschiedenen Kohlenhydrate mit ihren Bindungsformen und Summenformeln sind in Tabelle 1 im Anhang aufgelistet.

Neben dem Glykogen des tierischen Organismus und den wenigen einfachen Zuckern stellen pflanzliche Saccharide den mengenmäßig größten Anteil der in der Natur vorkommenden Kohlenstoffverbindungen dar (KIRCHGESSNER 2004). Funktionell unterteilt man Nicht-Struktur- und Strukturkohlenhydrate. Letztere sind in den Pflanzen am Aufbau der Zellwand beteiligt und stellen im Wesentlichen Fasermaterial dar (Zellulose, Hemizellulose u.a.). Im Darm aufspaltbar dienen die Nicht-Strukturkohlenhydrate (z.B. Saccharose, Stärke) dem tierischen Organismus als Energiequelle.

Literatur

2.1.2 Wichtige Kohlenhydrate in Futtermitteln von Pferden

Grünpflanzen produzieren während der Fotosynthese durch Lichtenergie aus Kohlendioxid und Wasser das Kohlenhydrat Glukose sowie Sauerstoff.



Nach der chemischen Reduktion im Chloroplasten, bei der CO_2 zu Glukose und Wasser (Calvin-Zyklus) umgesetzt wird, folgt die Verkettung von Glukose zu Mehrfachzuckern, die für die Speicherung oder zum Zellaufbau der Pflanze benötigt werden. Die Gehalte an Kohlenhydraten in pflanzlichen Futtermitteln der Nutztiere variieren erheblich. So enthalten Heu und Gras vor allem Polysaccharide vom *Zellulose*typ mit bis zehntausend β -D-Glukose-Molekülen in β -1,4-glykosidischer Bindung, welcher durch die Mikroflora im Darm langsam abgebaut wird. Zellulose wird wie auch *Hemizellulose* oder *Pektin* von den Pflanzen in die nicht-plasmatischen Räume sezerniert und gilt daher als strukturbildendes Kohlenhydrat (VAN SOEST et al. 1991, SCHUBIGER et al. 1998). Demgegenüber verfügen beispielsweise die Mehlkörper von Getreidekörnern (Stärkespeicherpflanzen) im Wesentlichen über *Stärke*, die schon präzäkal verdaut werden kann. In Futtermitteln befindet sich dieses Kohlenhydrat vor allem in Kartoffeln, Maniok und Erbsen sowie in Getreide (z.B. Weizen, Hafer, Gerste, Mais) und deren Schrote und Silagen. Stärkemoleküle setzen sich zu 10-30% aus α -1,4-glykosidisch verknüpfter Amylose, lineare Ketten mit helikaler Struktur, und zu 70-90% aus Amylopektin, stark verzweigte α -1,6-glykosidisch und α -1,4-glykosidisch verknüpfte Strukturen, (ROONEY und PFLUGFELDER 1986) zusammen. Das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin, die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen sowie die physikalische Form der Granula ist je nach Stärkeart ausschlaggebend für deren Abbaubarkeit (ROONEY und PFLUGFELDER 1986, KIENZLE et al. 1997). Neben der Zusammensetzung und Struktur von Glukosemolekülen spielt auch der Bearbeitungsgrad (mechanisch, thermisch, enzymatisch) eine wesentliche Rolle für Abbaubarkeit und Verstoffwechslung im Organismus (RADICKE 1990, POTTER et al. 1992, WILKE 1992, KIENZLE et al. 1992, MEYER et al. 1995, BOTHE 2001, PHILIPPEAU et al. 2014 und 2015).

Fruktane oder Fruktosane, als eine Gruppe von Oligo- und Polysacchariden, repräsentieren neben Stärke die wichtigsten Reservekohlenhydrate bzw. Nicht-Strukturkohlenhydrate (VAN SOEST et al. 1991, SCHUBIGER et al. 1998) höherer Pflanzen in den gemäßigten Breiten. Als wasserlöslicher Speicherstoff werden sie in den Vakuolen vegetativer Gewebe (POLLOCK 1986, NINESS, 1999) wie Wurzeln und Knollen oder Grashalmen, Blattscheiden, Blättern und Ästen abgelagert. Verglichen mit den C4-Gräsern der warmen Monate (C4-Pflanzen fixieren CO_2 für die

Literatur

Fotosynthese an Oxalacetat, eine Verbindung mit vier C-Atomen, vor) produzieren vor allem C3-Gräser (Fixation von CO₂ an Kohlenstoffverbindung mit drei C-Atomen (D-3-Phosphoglycerat)) der kühleren Jahreszeit den Reservestoff in höheren Konzentrationen (CHATTERTON et al. 1989). C3-Pflanzen besitzen keinen limitierenden Mechanismus für die Produktion von Fruktanen.

Das Fruktanmuster ist wie der Polymerisationsgrad und die Kettenlänge oft kennzeichnend für Art, Sorte und Erntezeitpunkt der Futterpflanze sowie das Klima des Standortes. Strukturell unterscheidet man je nach Bindungsstelle des Fruktosylrestes am Saccharosemolekül drei Grundtypen:

Den unverzweigten Inulintyp bzw. 1-Ketosenen mit β -2,1-Bindung der Fruktosylreste an Saccharose, den verzweigten Levantyp oder Phleintyp (Abb. 1), welche 6-Ketosenen mit β -2,6-Bindung zwischen Fruktosyl und Saccharose (Kestose oder 6-Kestotriose) darstellen sowie den Graminantyp, welcher sowohl β -2,1-Bindungen als auch β -2,6-Bindungen besitzt (MUSCHICK 1998).

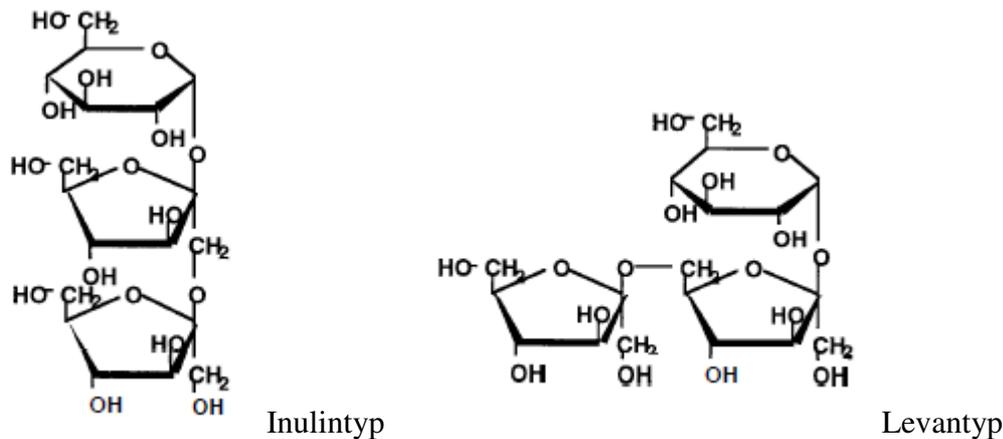


Abb. 1: Darstellung der Bindungsarten von Fruktanen des Inulin- und Levantypes

Eine weitere Gruppe bilden die Neokestosen oder 6G-Kestosen, die das Fruktosyl am C6-Atom des Glukosylrestes der Saccharose binden. Bei dieser Form der Fuktane liegt die Glukosylgruppe somit nicht endständig sondern intramolekular vor.

Das Vorkommen von Fruktanen wurde vor allem in ertragsstarken Gräsern (Deutsches -, Welsches -, Hybrid-Weidelgras) intensiv untersucht (POLLOCK und CAIRNS 1991, ZADOKS et al. 1974). Bei günstigen Witterungs- und Lichtverhältnissen und geringem Energiebedarf speichern Pflanzen die überschüssige Energie in Form von Fruktanen ab (POLLOCK 1986, LONGLAND und CAIRNS 2000). Knollen und Wurzeln lagern Fruktane vor allem im Herbst bei sinkenden Temperaturen ein. Im Frühjahr bei steigenden Temperaturen kommt es zum Abbau derselben (BACON und LOXLEY 1952). In Gräsern hingegen werden Fruktane vom Zeitpunkt des Schossens (ZADOKS et al. 1974) bis zur Milchreife eingelagert. Während der Teigreifung sind diese Kohlenhydrate kaum noch nachweisbar (BANCAL et al. 1992, BONNETT et al. 1997). Demnach sinkt der Fruktangehalt mit zunehmendem Blattalter. Der Gehalt in der Pflanze schwankt

Literatur

jedoch nicht nur jahreszeitlich (siehe Abb. 2) sondern unterliegt auch innerhalb eines Monats oder von Tag zu Tag erheblichen Schwankungen. BOWDEN et al. (1968), HOLT und HILST (1969) und LONGLAND et al. (1999) beschrieben einen Konzentrationsanstieg dieser Speicherkohlenhydrate über die Morgenstunde bis zum Nachmittag und den Abfall der Konzentration über Nacht. Zu diesen Ergebnissen gelangten auch LECHTENBERG et al. (1971) in Untersuchungen an Leguminosen. Besonders hohe Konzentrationen sind im Gras in Perioden mit nächtlichen Temperaturen um den Gefrierpunkt gefolgt von warmen und sonnigen Tagen zu messen. Demzufolge zählen Temperatur, Lichtintensität, Wasserverfügbarkeit und Fertilisation zu den wichtigsten Einflussgrößen für die Speicherung. Auch Globalstrahlung, Düngung oder NH_3 -Verfügbarkeit werden als Faktoren diskutiert.

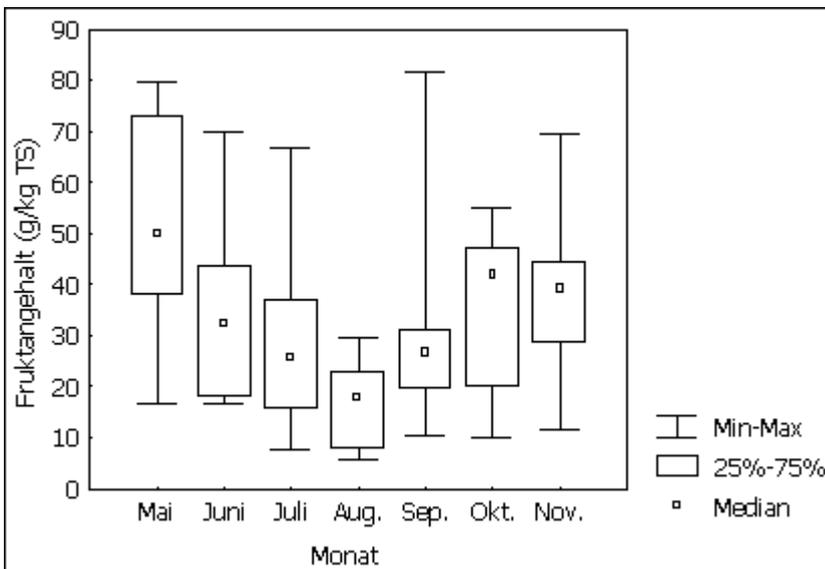


Abb. 2: Fruktangehalte im Verlauf der Weidesaison (DAHLHOFF und SOMMER 2004)

So sind auch die unterschiedlichen Ergebnisse der Untersuchungen zur Fruktankonzentration in Pflanzen zu erklären. Je nach Untersuchungsgebiet können zwischen 18 und 57 g /kg TS (VERVUERT et al. 2006) in Deutschland und 75 bis 279 g/kg TS (LONGLAND und BYRD 2006) in Großbritannien nachgewiesen werden. In Frankreich wurden unter bestimmten Bedingungen (Dürre, mediterrane Zonen) sogar bis 400 g/kg TS (VOLAIRE und LELIEVRE 1997) gemessen.

Die Stellung der Fruktane als kurzzeitiger Energiespeicher in der Pflanze gilt als gesichert. Über weitere Funktionen als Schutz vor Stressoren wie Trockenheit (VIRGONA und BARLOW 1991, HENDRY 1993, PUEBLA et al. 1997), tiefe Temperaturen (SUZUKI und NASS 1988, SUZUKI 1989, TOGNETTI et al. 1990, SMART et al. 1994), Sauerstoffmangel (ALBRECHT et al. 1993, 1997, 2004, SMART et al. 1994) oder Frost (PUEBLA et al. 1997, SUZUKI und NASS 1988, SUZUKI 1989, TOGNETTI et al. 1990) wird spekuliert. Eine regulatorische Wirkung auf den

Literatur

osmotischen Druck während des Zellwachstums und der Zellstreckung (SCHNYDER et al. 1988, SCHNYDER und NELSON 1989, BIELESKI 1993, SOLHAUG und AARES 1994) wird ebenfalls in Betracht gezogen.

In der Nahrungsmittelproduktion werden Fruktane als Prebiotika eingesetzt, da sie als unverdauliche Nahrungsbestandteile den Dickdarm erreichen und erst hier durch die Mikroflora fermentiert werden (SALYERS et al. 1977, WOLIN und MILLER 1983, ROBERFROID et al. 1993, LEWIS 1996, NINESS 1999, VAN LOO et al. 1999, LONGLAND und CAIRNS 2000, HOFFMAN et al. 2001, HUNTINGTON und POLLITT 2002, FLICKINGER und FAHEY 2002). Prebiotika gelten als Immunstimulanzien, welche die Proliferation der in der Darmflora erwünschten Bifidobakterien und Laktobazillen (MITSUOKA 1987, MANLEY-HARRIS und RICHARDS 1996, GIBSON und ROBERFROID 1995, KLEESSEN 2007) begünstigen. Ihnen werden unter anderem begünstigende Einflüsse auf die Vitaminsynthese sowie den Blut-, Cholesterol-, Ammoniak- und Harnstoff-Spiegel oder die Reduktion des Darmkrebsrisikos zugeschrieben (JENKINS 1999). Viele weitere positive Effekte sowie Krankheitsprävention werden im Zusammenhang mit der Nahrungsergänzung durch Fruktane diskutiert. Eine Überflutung des Dickdarms mit diesen leicht fermentierbaren Zuckern stellt jedoch aufgrund der Gefahr von Dysbiosen ein Gesundheitsrisiko (siehe Kap. 3) dar.

Inulin, auch Alantstärke genannt, ist in Abhängigkeit vom Molekulargewicht (30 – 100 Fruktoseeinheiten) ein mehr oder weniger gut wasserlösliches Fruktan. Besonders in Korbblütlern wie Topinambur, Artischocke, Zichorie, Löwenzahn sowie Dahlie, Banane, Lauch, Knoblauch, Zwiebel und Weizen kommt Inulin als Reservestoff vor. Großtechnisch über Heißwasser-Extraktion gelöst, aufbereitet und sprühgetrocknet, wird Inulin für die menschliche Ernährung aufgrund seiner Gelbildungseigenschaft in Margarine, Brotaufstrich oder Speiseeis und als Prebiotikum verarbeitet. Auch in der tierischen Ernährung nutzt man diese positiven Eigenschaften.

Zur Simulation und Untersuchung alimentär bedingter Dysbiosen des Verdauungstraktes und deren Folgeerkrankungen bei Pferd und Wiederkäuer wird Inulin als Vertreter der Fruktane sowohl bei in vitro (BAILEY et al. 2002) also auch in vivo Studien (FRENCH und POLLITT 2004a, THOEFNER et al. 2005) verwendet (siehe Kap. 2.4 Untersuchungsmethoden). Weiterhin kommt es in Verdaulichkeitsstudien am Schwein (BRANNER et al. 2004, BOEHMER et al. 2005) zum Einsatz.

2.2 Kohlenhydratverdauung beim Pferd

Im Futter unterteilt man Kohlenhydrate nach der Abbaubarkeit durch körpereigene Enzyme. Zu den Kohlenhydraten, welche durch körpereigene Enzyme (Amylasen, Saccharidasen) von Säugern

Literatur

verdaulich sind, zählen die hydrolysierbaren Zucker. Nicht-Gerüstsubstanz-Kohlenhydrate und Nicht-Stärke-Polysaccharide gehören zu den fermentierbaren Kohlenhydraten. Unverdaulich für Säuger und mikrobielle Darmflora ist Lignin. Die Zuordnung der einzelnen Vertreter in diese Gruppen ist Abb. 3 zu entnehmen.

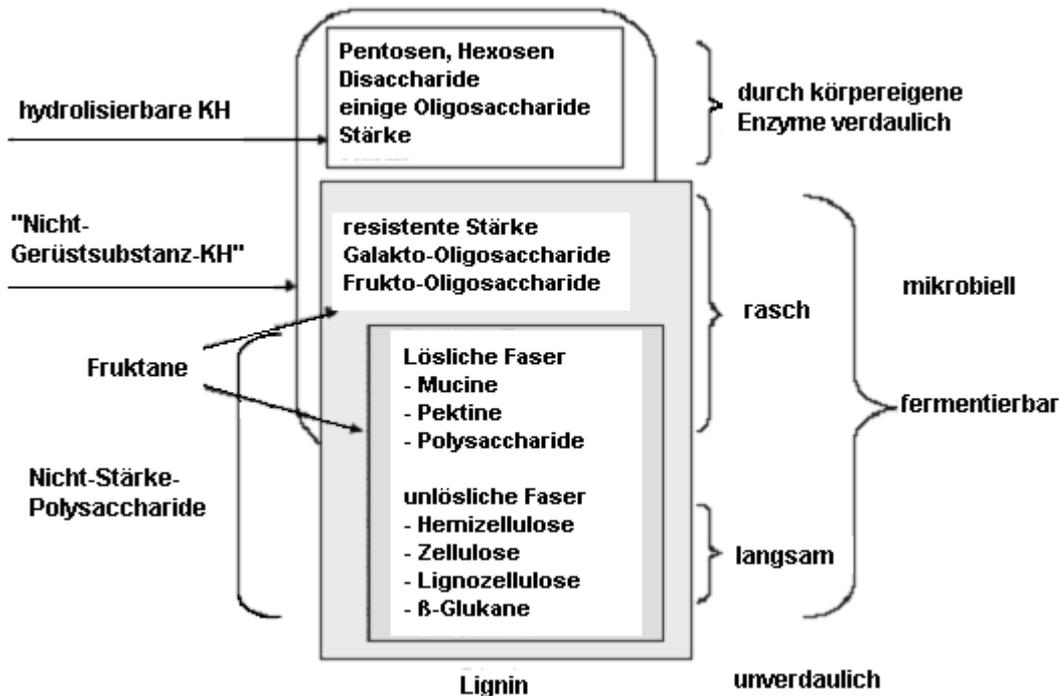


Abb. 3: Schematische Darstellung der Kohlenhydratfraktionen (modifiziert nach HOFFMANN et al. 2001)

2.2.1 Enzymatische Aufspaltung

Die Kohlenhydratverdauung beginnt während des Einspeichelns der Nahrung im oberen Verdauungstrakt. Hier wirkt die im Speichel lokalisierte α -Amylase Ptyalin. Durch die Säuren des Magens wird danach ein Teil der Kohlenhydrate hydrolysiert. Einige säurefeste Bakterien sind in der Lage, lösliche Zucker bereits im Magen zu Laktat abzubauen (MEYER et al. 1995, DE FOMBELLE et al. 2003). Die Pankreasamylasen und Saccharidasen der Dünndarmmukosa spalten anschließend α -1,4 oder α -1,6-glykosidische Bindungen der Polysaccharide (ECKERT 1993, ROBERTS 1974) und stellen so deren Metabolite dem Stoffwechsel zur Verfügung. Im Speziesvergleich fällt die relativ geringe Amylaseaktivität von Pferden auf (Tab. 1). Innerhalb des equinen Verdauungstraktes nimmt sie vom Duodenum zum Zäkum hin ab (ROBERTS 1974, RADICKE et al. 1992). In ihren Untersuchungen stellten RADICKE et al. (1992) und KIENZLE et al. (1994) jedoch individuelle Unterschiede der Amylaseaktivität verschiedener Pferde fest.

Literatur

Tab. 1: Amylaseaktivität [I.E./g uS] im Dünndarmchymus verschiedener Haustierarten (modifiziert nach PLUMHOFF 2004)

SPEZIES	AMYLASEAKTIVITÄT	AUTOR
Hund	50-600	KIENZLE (1988)
Schwein	400-600	KAMPHUES (1987)
Katze	20-40	KIENZLE (1987)
Pferd	0-100	RADICKE et al. (1992)

Der Abbau löslicher, leicht verdaulicher Polysaccharide erfolgt also weitestgehend durch Enzyme des Dünndarms (HOFFMAN et al. 2001) während Zellulose, Pektine, Fruktane und andere Polysaccharide aufgrund der abweichenden β -2,1-Bindung für die Enzyme der Säuger als nicht abbaubar gelten und den Dünndarm zum Großteil unverdaut passieren. Man bezeichnet sie daher auch als Ballaststoffe oder Prebiotika.

Diese unverdaulichen Kohlenhydrate können Pferde, Wiederkäuer und andere Tiere mit so genannten Gärkammern über Fermentation durch die hier lokalisierte Mikroflora nutzbar machen (ROBERFROID 1997) und unter Bildung von flüchtigen Fettsäuren abbauen (HOFFMAN 2003). Nach MÖSSELER (2004) beschränkt sich jedoch beim Pferd diese mikrobielle Fermentation, zumindest auf Inulin bezogen, nicht nur auf den Dickdarm, sondern ist auch in präzäkalen Abschnitten des Verdauungstrakts nachweisbar.

2.2.2 Physiologische Mikroflora des equinen Verdauungskanals

Die Mikroflora des Verdauungskanals besteht aus Bakterien, Protozoen und Pilzen und unterliegt in Bezug auf Zusammensetzung und Bakterienanzahl individuellen Schwankungen. So kann man zwischen allogenen und autogenen Einflüssen unterscheiden. Als allogene bezeichnet man vom Wirt oder von außen einwirkende Faktoren, zum Beispiel Nährstoffangebot, pH-Wert, Darmmotilität oder Körpertemperatur. Demgegenüber gelten Nährstoffkonkurrenz oder produzierte Bakterizide und Stoffwechselmetabolite als autogene Faktoren, da sie von den Mikroorganismen selbst ausgehen. Daher variiert die Bakterienanzahl nicht nur von Tier zu Tier, sondern auch entsprechend der Lokalisation innerhalb des Verdauungstraktes und Fütterung. So findet man im Mageninhalt 10^8 - 10^9 KBE/g (MEYER et al. 1995, DE FOMBELLE et al. 2003) und im Dünndarmlumen 10^9 KBE/g (KERN et al. 1974). Im Dünndarm dominieren vor allem proteolytische Bakterien mit circa 10^6 KBE/g Chymus. Die Konzentration steigert sich vom Duodenum über Jejunum bis hin zum Ileum (GREISS 1995).

Literatur

Demgegenüber können im Zäkum und Kolon bis zu $3 - 6 \times 10^9$ KBE/g und ca. 1000 Protozoen/g sowie ebenso viele Pilze (KERN et al. 1974, MOORE und DEHORITY 1993, ORPIN 1981) nachgewiesen werden. Der Vergleich der Anzahl koloniebildender Einheiten (Tab. 2) veranschaulicht die hohe Leistung der mikrobiellen Verdauung im Dickdarm.

Tab. 2: Keimspektrum [KZ/g] der Darmabschnitte vom Pferd nach Heufütterung (nach KERN 1974)

	ILEUM	ZÄKUM	KOLON, DORSAL
Gesamtkeimzahl	$2,0 \times 10^9$	$6,4 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$
Zellolytische Keime	-	$4,3 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$
Protozoen	-	567	-

Im Dickdarm dominieren mit 40 bis 45% obligat oder fakultativ anaerobe Bakterien (KERN et al. 1973). Nach SMITH (1965), GARNER et al. (1978) und SPROUSE und GARNER (1982) gehören zu dieser Gruppe Clostridien sowie Laktobazillen und Streptokokken. Es werden aber auch Enterobakterien (fakultativ anaerob) oder Bazillen (aerob oder fakultativ aerob) nachgewiesen. Hauptsächlich für den Strukturabbau verantwortliche Spezies sind nach BONHOMME (1986) und JULLIAND et al. (1999) *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* und *Ruminococcus albus*. Den Abbau von Glukose und Amylose leisten Streptokokken und Laktobazillen, genauer *Lactobacillus mucosae* und *L. mitsuokella jalaudinii* (AL JASSIN et al. 2005). Laktat setzen vor allem *Veillonella sp.* und *Megasphaera sp.* (BARUC et al. 1983) um. In vitro wurde den zäkalen Bakterien auch eine proteolytische Aktivität nachgewiesen (BARUC et al. 1983). Hieraus wurde eine Beteiligung der Darmbakterien am Aminosäurestoffwechsel der Pferde vermutet. Die mikrobielle Zusammensetzung des Dickdarmchymus ist von der Fütterung (KERN et al. 1973, GARNER et al. 1978) abhängig. So wurden nach Haferzulage steigende Gesamtkeimzahlen, die Abnahme der Zahl gram-negativen und gram-positiven Stäbchen sowie gram-negativen Kokken und eine Zunahme der Anzahl gram-positiver Kokken und Laktobazillen belegt. Neben Bakterien werden im Dickdarm des Pferdes auch Protozoen mit zellolytischer und lipolytischer Aktivität angetroffen. Typische Protozoen des Dickdarms sind *Cycloposthium spp.* und *Blepharocorys spp.* (BONHOMME-FLORENTIN 1969, KERN et al. 1973). Eine untergeordnete Rolle spielen die hier lokalisierten Pilze (ZEYNER 2003). ORPIN (1981) beschreibt sie als strikt anaerobe Phykomyzeten.

Literatur

Im Verlauf des Magen-Darm-Traktes der Pferde wechselt also die Flora qualitativ von säuretoleranten, laktatproduzierenden Bakterien, wie Laktobazillen und Streptokokken (gram-positive) hin zu gram-negativen Bakterien im Zäkum und Kolon. Der Quotient von gram-negativen und gram-positiven Bakterien liegt am Ende des Verdauungstraktes zehnmal höher als in den vorangegangenen Darmabschnitten (KERN et al. 1974). Fäkal ausgeschieden werden nach COSTA et al. (2012) Proteobacteriae, Actinobacteriae, Firmicutes, Bacteroides und Spirochaetes, in einer Artenvielfalt von 142 bis 230 verschiedenen Spezies.

Über die Fähigkeit, speziell Fruktane zu verarbeiten, verfügt eine Reihe von Mikroorganismen. Dazu zählen nach ZIOLECKI et al. (1992) sowie ROBERFROID und DELZENNE (1998) neben allen Bifidobakterienstämmen, mit Ausnahme von *Bifidobacterium bifidum*, auch *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecialis*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides fragilis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lactobacillus acidophilus* und *Clostridium spp.*, *Selenomonas ruminantum*, *Treponema bryantii*, *Treponema saccharophilum* sowie einige Protozoen. GÄNZLE und FOLLADOR (2012) beschrieben ausführlich die verschiedenen enzymatischen Abbaumöglichkeiten von Fruktanen der intestinalen Laktobazillen.

2.2.3 Fermentation von Kohlenhydraten im equinen Dickdarm

Nicht verdauter rohfaserreicher Nahrungsbrei wird im Blinddarm und Grimmdarm durch mikrobielle Fermentation aufgeschlossen (SALYERS et al. 1978). Metabolite sind neben flüchtigen Fettsäuren und Laktat die Gase Kohlendioxid (CO₂), Wasserstoff (H₂), Methan (CH₄), Schwefelwasserstoff (H₂S) und Merkaptane (WOLIN und MILLER 1983, DROCHNER und MEYER 1990, ZENTEK 1991 und 1992). Vor allem das Fettsäuremuster, die Laktat- und Ammoniakkonzentration sowie der pH-Wert werden als Indikatoren für die Zusammensetzung der intestinalen Flora verwendet (KAMPHUES 1992).

Dem geringen pH-Wert um 2 bis 5 (siehe Tab.3) im Mageninneren (KERN et al. 1974) stehen pH-Werte um 6,5 bis 7,5 im Zäkum gegenüber.

Literatur

Tab. 3: pH-Werte des equinen Verdauungskanals nach verschiedenen Rationen (modifiziert nach MEYER und COENEN 2002)

DARMABSCHNITT	KRAFTFUTTER	RAUFUTTER
Magen		
Fundus	5,7	5,4
Pylorus	3,0-5,0	2,6
Duodenum	5,6-8,0	6,3
Jejunum	7,0-8,0	7,1
Ileum	7,0	7,5
Zäkum	6,5-7,5	6,7
Kolon	6,0	6,6

Nach Konzentratgabe, wie Getreidefütterung (WILLARD et al. 1977, MEYER et al. 1982, RADICKE 1990) sowie nach Mais- (6,5 bis 7,3) oder Haferfütterung (6,8 bis 7,8) (LANDES 1992) kommt es zu einer postprandialen pH-Werte-Senkung im Zäkumchymus. Die tiefsten Werte wurden 4 bis 6 Stunden postprandial gemessen (WILLARD et al. 1977). Zum gleichen Ergebnis kamen CRAWFORD et al. (2007) nach Gabe von Inulin zu einer Heurration oder MILINOVICH et al. (2007) nach der Gabe von Oligofruktose. Hier sank der pH-Wert zeitweilig auf unter 4,5. In den Untersuchungen von GOODSON et al. (1988) lag der pH-Tiefstwert nach Umstellung der Fütterung von Luzerneheu (pH 6,4) auf Konzentratfutter bei 5,8. Diese Tiefstwerte wurden 6 bis 8 Stunden postprandial gemessen. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Fäzes gilt als belegt (ZEYNER et al. 1992). MILINOVICH et al. (2006) beschrieben einen niedrigeren pH-Wert bei Fütterung von Oligofruktose nach 8 Stunden (6,0) und 16 Stunden (4,3). Dies deckt sich mit den Messungen von VAN EPS und POLLIT (2006), die nach Verabreichung von Oligofruktose per Nasenschlundsonde fäkale pH-Werte bis zu 3,7 beobachteten. Bei der Fütterung eines zunehmenden Heuanteils in der Ration kann man einen Anstieg des fäkalen pH-Wertes beobachten (ZEYNER et al. 2004, WILLIAMSON et al. 2007). Auch die Fütterungssequenz von Heu und Konzentrat wiesen einen signifikanten Einfluss auf den pH-Wert auf (ZEYNER et al. 2004). Der pH-Wert des Zäkums ist also im Wesentlichen beeinflusst von der Art der Futtermittel und hat laut BRØKNER et al. (2012) auch einen signifikanten Einfluss auf deren Verdaulichkeit.

Die produzierten flüchtigen Fettsäuren (FFS oder short chain fatty acids; SCFA) sind vor allem Azetat, Propionat und Butyrat. KERN et al. (1974) wiesen ein Verhältnis von 74,7 % Azetat, 18,4

Literatur

% Propionat, 5,6 % Butyrat im Zäkum nach. Die SCFA stehen dem Organismus als Energieträger zur Verfügung (FLEMING und ARCE 1986). So liefern sie etwa 70% der in der Dickdarmmukosa umgesetzten Energie (ROEDIGER 1980). DALY et al. (2001) stellten fest, dass kurzkettige Fettsäuren 60 – 70% der Energiequelle für Pferde darstellen, da diese nach Fermentation von löslichen Zucker und Strukturkohlenhydraten über die Epithelien des Verdauungstraktes resorbiert werden. BERG et al. (2005) schlussfolgerten, dass die Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren ein Maß für die intestinale Gesundheit des Pferdes ist.

Entscheidend für den Beitrag an der Energiebilanz des Tieres ist die Nicht-Stärke-Polysaccharid-Fraktion des Futtermittels. Pektinreiche Nahrung liefert, da schneller fermentierbar, eine größere Ausbeute als beispielsweise Heu (GLINSKY et al. 1976, MOORE-COLYER et al. 2003). Je nach Anteil der Futtermittelration an Rohfaser oder stickstofffreien Extraktstoffen werden demnach unterschiedliche Mengen an Essig-, Propion- und Buttersäure gebildet. Gesteigerte Rohfasergehalte führen zu vermehrter Azetatproduktion und verminderten Propiongehalten somit zu einer Azetat : Propionat : Butyrat Ration von 3,5 : 2,5 : 1 im Zäkuminhalt. Eine konzentratreiche Fütterung hingegen steigert die Produktion an Propionat und Butyrat und senkt den Azetatanteil. Die Erhöhung des Stärkeanteils einer Ration führt zur Zunahme der Gesamtkeimzahlen (KERN et al. 1973, GARNER et al. 1978, MEDINA et al. 2001) und somit auch zu einer gesteigerten Produktion von flüchtigen Fettsäuren und dem Absinken des pH-Wertes (KERN et al. 1973, GARNER et al., 1975, RADICKE et al. 1991, MEDINA et al. 2001, DE FOMBELLE et al. 2003). Im Gegensatz zum Jejunum korreliert dieser pH-Wert-Abfall im Zäkum nicht mit der Laktatkonzentration, sondern mit der Konzentration an flüchtigen Fettsäuren (LANDES, 1992).

Bei der Fermentation gram-positiver Laktobazillen entsteht Laktat, ein Razemat aus L- und D-Laktat. Es kann durch die Darmwand absorbiert werden und tritt so in den Blutstrom über. Die Laktatkonzentration in Zäkum und Kolon ist ein Resultat des Zustroms aus den oberen Darmetagen, Produktion durch Mikroben und Resorption über die Darmwand. Die Menge des gebildeten Laktats ist direkt proportional zur verstoffwechselten Kohlenhydratmenge (DROCHNER 1987, SCHÜNEMANN 1989) und korreliert positiv mit dem Wachstum der gram-positiven Darmflora. Die Steigerung der Laktatkonzentration bei stärkereicher Fütterung gegenüber faserreicher Rationen bestätigten auch GARNER et al. (1977), RADICKE et al. (1991), JULLIAND et al. (2001) oder MEDINA et al. (2002).

Ammoniak wird von den Mikroorganismen des Dickdarmes aus der Spaltung von Harnstoff mittels Urease oder der Desaminierung von Proteinen (unverdautes Futterprotein, Bakterienprotein, endogene Proteine) gewonnen (MEYER und COENEN 2002). Daher sind hier auch höhere Konzentrationen als im Dünndarmchymus messbar (KAMPHUES 1987). Bei gesteigerten Ammoniakkonzentrationen wird auch die Zunahme der Bakterienproliferation nachgewiesen. Daher

Literatur

dient Ammoniak als Parameter für die Intensität mikrobieller Umsetzungen von Stickstoffverbindungen.

Als Indikator für die metabolische Aktivität der obligat und fakultativ anaeroben Mikroorganismen wird die Bildung verschiedener Gase genutzt. Durch die Möglichkeit der indirekten, nicht invasiven Messung mittels Exhalationstests wurden die Gase Wasserstoff (H₂) und Methan (CH₄) eingehend untersucht. Hierbei wird davon ausgegangen, dass der Einfluss der Rationsgestaltung über die mikrobielle Produktion der Gase im Darm pulmonal messbar ist (NYARI 1992, MÖSSELER 2004). Dies erklärt man durch die Diffusion der gebildeten Gase aus dem Darm ins Blut und deren pulmonalen Ausscheidung (ZENTEK 1992).

Nach MÖSSELER (2004) und NYARI (1992) ist der Dünndarm die Hauptlokalisierung der Wasserstoffbildung, wobei auch geringe Mengen an Methan gebildet werden. Im Dickdarm sind die Verhältnisse dagegen umgekehrt. Eine geringe Aktivität der Wasserstoffbildner und überwiegende Produktion an Methan sind hier nachweisbar (NYARI 1992, MÖSSELER 2004). Der produzierte Wasserstoff wird von Methanbildnern oxidiert und so zur Gewinnung von Energie genutzt. Dabei wird Methan frei. Dieser Interspezies H₂-Transfer ist wichtig, damit es zu keiner Anreicherung von H₂ und Hemmung der Wasserstoffbildner kommt (MÖSSELER 2004). Der beschriebene Vorgang wird als methanogener Fermentationstyp von Cytochrom-freien hydrogenotrophen Archaea (z.B. *Methanobrevibacter curvatus*, *M. filiformis*, *M. oralis*, *M. gottschalkii* u.v.a) bezeichnet. Eine weitere Möglichkeit Methan herzustellen, ist die Reduktion von Azetat, Methanol und Methylamin. Auf diesen Stoffwechselweg sind Cytochrom-haltige, azetotrophe Archaea (z.B. *Methanobrevibacter ruminantium*, *M. cuticularis*, *M. smithii* u.v.a.) spezialisiert, von denen nur wenige H₂ und CO₂ nutzen können (MAH et al. 1977, BRYANT 1979). Das Wachstum beider methanogenen Bakterientypen steht in direkter Abhängigkeit der H₂-Konzentration des Milieus. Cytochrom-haltige Archaea benötigten etwa 10 Mal höhere H₂-Konzentrationen als Cytochrom-freie Methanogene (BOONE et al. 1993; GARCIA et al. 2000).

Dem gegenüber steht der azetogene Fermentationstyp. Diese reduktive Azetogenese (nach der Gleichung: $2 \text{ CO}_2 + 4 \text{ H}_2 \leftrightarrow \text{Azetat} + 2 \text{ H}_2\text{O}$) ist für den Dickdarm spezifisch und wird auch als „hydrogen sinks“ bezeichnet. Hierbei wird durch Azetatbildung weniger Methan produziert, was einer Optimierung der Ausbeute an endogen nutzbaren Metaboliten entspricht (BREVES und DIENER 2000) und somit den engerieeffizienteren Stoffwechselweg darstellt. Die Azetogenese ist abhängig vom Wasserstoffpartialdruck. Steigende H₂-Konzentrationen hemmen als Abfallprodukt der Azetogenese den Stoffwechsel azetogener Bakterien (GRAF 1999). Für die Wasserstoffproduktion während der Fermentation kommen zum einen das „Escherichia coli-System“ und zum anderen das „Clostridien-System“ in Betracht (ZAJIC et al. 1978). Beiden Systemen dient Pyruvat als Substrat. Enterobakterien bilden daraus Wasserstoff und Kohlendioxid

Literatur

über den Zwischenschritt der Spaltung in Formiat und Acetyl-CoA. Die zum „Clostridien-System“ zählenden Bakterien koppeln die Pyruvatoxidation an die Reduktion von Elektronenüberträgern wie beispielsweise Ferredoxin (Clostridien) (MILLER und WOLIN 1979). Diese dienen als Elektronendonatoren für eine Hydrogenase, welche die Reduktion von Protonen zu molekularem Wasserstoff katalysiert. Den größeren Anteil machen im Dickdarm wahrscheinlich die zum „Clostridien-System“ zählenden, strikt anaeroben Arten Clostridium, Ruminococcus, Megasphaera, und Butyrivibrio aus.

2.3 Dysbiose

Die Veränderung des physiologischen Milieus, auch Dysbiose genannt, stellt eine der wichtigsten Krankheitsursachen im Darmkonvolut von Equiden dar. Nicht selten folgt eine Kaskade von Begleiterkrankungen des gesamten Organismus, an dessen Ende auch die Hufrehe (siehe unten) anzusiedeln ist. Die Genese von Dysbiosen ist Thema der folgenden Ausführungen.

2.3.1 Ursachen von Dysbiosen

Für Dysbiosen kommen verschiedenste Ursachen in Betracht. Störungen treten vor allem im Zusammenhang mit Kohlenhydratüberladung, geringer Raufutteraufnahme oder abruptem Futterwechsel sowie Hefe-Kontamination der Futtermittel aber auch hastigem Fressen oder postprandialer, starker physischer Belastung auf. Fütterungsassoziierte Gasbildung im Dickdarm beobachtete MEYER (1991) sowohl nach Aufnahme von jungem, rohfaserarmerem Grünfütter und Äpfeln als auch von Leguminosekörnern und Trockenschnitzeln. Dysbiosen wurden aber auch bei Weidehaltung beschrieben (TREIBER et al 2006, HARRIS et al. 2006, CRAWFORD et al. 2007).

2.3.2 Folgen von Dysbiosen

Gegenstand der nachfolgenden Erläuterungen ist die zäkale Azidose, bedingt durch eine überhöhte Aufnahme präzäkal leicht verdaulicher Kohlenhydrate.

2.3.2.1 Enterale Effekte

Bei Überschreitung der Amylasekapazität im Dünndarm kommt es zur Anflutung unverdauter Kohlenhydrate im Dickdarm (LONGLAND und CAIRNS 2000). Diese lösen eine Zunahme der Bakterienanzahl und damit über vermehrte Bildung von flüchtigen Fettsäuren und Laktat das Absinken des pH-Wertes und eine vermehrte Gasbildung aus.

Literatur

2.3.2.1.1 Milieuveränderungen

Aus den veränderten Milieubedingungen resultiert eine Selektion der Mikroflora. Die dominierende gram-negative Population wird von gram-positiven Mikroorganismen abgelöst (AL JASSIM und ROWE 1999, BAILEY et al. 2003). Hierbei etablieren sich in erster Linie Bifidobakterien. BAILEY et al. (2003) beschrieben nach einem signifikanten pH-Wert-Abfall die deutliche Zunahme der Streptokokken und Laktobazillen. MILNOVICH et al. (2007) wiesen *Streptococcus bovis* und *equinus* als stark proliferierende Bakterien anhand von Fäzesproben nach.

2.3.2.1.2 Aufgasung und Kolik

Durch die oben beschriebenen Effekte von unverdauten Kohlenhydraten auf das Darmmilieu kommt es zur vermehrten Gasbildung. Ein Aufgasen einzelner Darmabschnitte (Tympanie) und Dehnungen der Darmwand mit mangelnder Blut- und Sauerstoffversorgung führen zu eingeschränkter Darmperistaltik. Dies verursacht schmerzhafte Zustände (Kolik). In schweren Fällen kommt es durch den erhöhten intraabdominalen Druck zur Einschränkung der Atmung und Blutzirkulation mit schweren Allgemeinstörungen wie Pulsbeschleunigung, Zyanose und Schweißausbruch (LAUNER et al. 1990, WINTZER 1999).

Den Zusammenhang des Wechsels von faserreicher zu stärkereicher Ration und den damit verbundenem alimentären Stress untersuchten DESTREZ et al. (2015). Sie beurteilten das Verhalten der Pferde (Liegen, Ruhen, Fressen, Wachphase, Neophobie-Test, Sozial-Test) und beschrieben die Korrelation von Verhaltensänderungen (längeren Wachphasen, Ängstlichkeit) mit der Zunahme von zäkalen laktatverwertenden Spezies und amylolytischen Kolonbesiedlern.

2.3.2.2 Extraenterale Effekte

Mit der extremen pH-Wert-Absenkung im Blinddarm gehen Schädigungen der Schleimhaut und gesteigerte Absorption von vasoaktiven Stoffen wie Endotoxinen (GARNER et al. 1978, SPROUSE et al. 1987, ZERPA 2005), Histamin (GARNER et al. 2002) und anderen Aminen (BAILEY et al. 2002, 2003) oder das von *Streptococcus bovis* produzierte pyogene Exotoxin B einher. Dysbakteriosen mit schwerwiegenden Verdauungsproblemen und Begleiterkrankungen sind die Folge (GARNER et al. 1978). Das Spektrum reicht dabei von lediglich reduzierter Futteraufnahme, Apathie, sinkendem Kot-pH-Wert (pH < 6) und Diarrhoe in leichten Fällen (RALSTON et al. 1983, RADICKE et al. 1990, THOEFNER et al. 2004) sowie lokalen Schädigungen der distalen Gliedmaße oder metabolische Veränderungen aufgrund von glykämischen und insulinämischen Reaktionen (siehe Kap. Hufrehe) bis zu schweren Allgemeinstörungen (siehe Kap. Aufgasung und Kolik) mit teils tödlichem allgemeinen Schock. Dies belegten diverse Studien mit Stärkezufuhr von

Literatur

15 g/kg LM/d (GARNER und SPROUSE 1982) und 0,4 % LM (POTTER et al. 1992) oder 10 g/kg LM Oligofruktose (NOURIAN et al. 2007, VAN EPS und POLLITT 2006). Das chronische metabolische Ungleichgewicht mit hoher glykämischer und insulinämischer Response bei Fütterung von hohen Konzentrationen an Nicht-Strukturkohlenhydraten wurde in Studien von GARNER et al. (1977) oder KORNFELD und HARRIS (2003) beschrieben. In Abbildung 4 ist der Zusammenhang zwischen Laktatkonzentration im Blutplasma und dem Grad der Folgeerkrankung dargestellt.

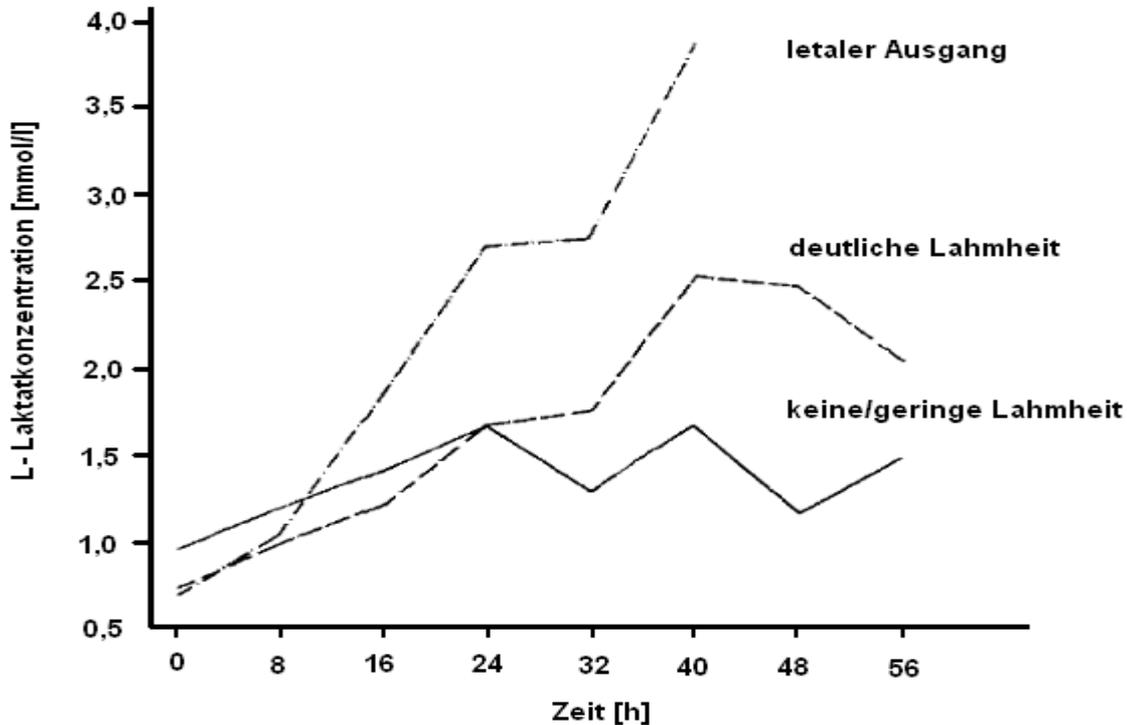


Abb. 4: Entwicklung der Blutlaktatkonzentrationen bei Pferden nach einmaliger Gabe von 14,9 g Maisstärke/kg LM (GARNER et al. 1977)

2.3.2.2.1 Hufrehe

Die Pathogenese einer Hufrehe (Laminitis, Pododermatitis diffusa aseptica) geht immer mit der Störung der Mikrozirkulation im Kapillarbereich des Zehenendorgans und der Freisetzung von Entzündungsmediatoren einher. Nach HOOD et al. (1993) und MORGAN et al. (2003) stellen Reperfusionstörungen und Ischämie der Huflamellen durch Vasokonstriktion grundlegende Ereignisse bei der Entstehung von Laminitis dar. MOORE und ALLEN (1996) oder POLLITT und MOLYNEUX (1990) sind der Ansicht, dass es im pathogenetischen Ablauf als Folge der Hypoperfusion der digitalen Gefäße zu einer Ischämie, Nekrose und Ödem der Lamina kommt. Durch venöse Abflussstörung oder Kontraktion der Arteriolen und Umleitung des Blutstromes über arterio-venöse Shunts kommt es zum Austritt von Blut aus dem Gefäßsystem (HERTSCH und

Literatur

MADEICZIK 1993) in den transkapillären Raum und zu einer kapillären Hypoperfusion der Lamina. Eine Ischämie der Huflederhaut und Lösung der Verbindung zwischen Hufhorn und Huflederhaut sind die Folge. Aufgrund eines chronischen Krankheitsgeschehens wird durch den beschriebenen Erguss der Aufhängeapparat des Hufbeines gelockert, welches unter dem Druck der Körperlast rotiert. Im weiteren Verlauf können die Deformierung der Hornkapsel (Knollhuf), Drucknekrosen sowie Durchbrechen des knöchernen Hufbeins durch die Hufsohle auftreten. Auch das sogenannte Ausschuheln, bei dem es zum kompletten Verlust der Hornkapsel kommt, wird als Folge der Laminitis beobachtet. Für die Prognose entscheidend sind Krankheitsverlauf und Stadium in dem therapeutisch eingegriffen wird. Ohne das Erkennen und Ausschalten der spezifischen Ursachen ist eine Therapie aussichtslos.

CZECH (2006) unterteilt die Ätiologie der Hufrehe wie folgt:

Systemische Erkrankungen

- gastrointestinal, besonders bei begleitendem Endotoxinschock (Kolik/ Gastroenteritis, besonders Kolitis/ Diarrhoe)
- reproduktiv (Plazentitis /Nachgeburtsverhaltung/ Zyklusanomalien)
- bakterielle und virale Allgemeinerkrankungen (Pneumonie/ Sepsis)
- muskuloskelettal (Rhabdomyolysis)
- renal (Dehydration / Schock)

Endokrine Imbalancen

- equines Cushing Syndrom (ECS); Pituitary Pars Intermedia Dysfunktion (PPID)
- Hyper- / Hypothyreoidismus
- Zyklusanomalien

Mechanische Überbelastung

- Pflasterrehe (Marschrehe)
- Belastungsrehe (supporting limb laminitis)
- Beschlagsfehler oder starke Stellungsveränderungen

Intoxikationen und / oder alimentäre Überversorgung

- Schwarze Walnuss (USA black walnut)
- Kernholzspäne (heartwood shavings)
- Kortikosteroide und/oder andere Medikamente
- Kohlenhydratüberversorgung (Junges Gras, Gras mit hohem Fruchtgehalt/ Getreide)

Idiopathische / unbekannte Ursachen

- (Stress bedingt erhöhten endogenen Kortisolspiegel)

Literatur

Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist der Zusammenhang von kohlenhydratreicher Fütterung und Hufrehe.

Fütterungsbedingte Pododermatitis diffusa aseptica

Über die Pathogenese der fütterungsbedingten Pododermatitis diffusa aseptica gibt es verschiedene Theorien. Laut MOORE et al. (2004) gibt es im pathogenetischen Ablauf zumindest in vitro 3 Möglichkeiten: vaskulär-hämodynamisch oder toxisch/metabolisch/enzymatisch oder traumatisch-mechanisch. Die Arbeitsgruppe hält in vivo allerdings eine multifaktorielle Ätiopathogenese für wahrscheinlich.

Als Beweise für den Zusammenhang von Floraveränderung im Dickdarm und Laminitis sind die Studien von ROWE et al. (1994) und BAILEY et al. (2002) zu interpretieren. Darin verhinderten sie die Verdrängung der gram-negativen durch die gram-positiven Mikroorganismen mittels Virginiamycin, eines Streptokokken spezifischen Antibiotikums oder die Abpufferung des pH-Abfalls mittels anorganischer Kalziumsalze. So gelang es Ihnen die durch Kohlenhydratüberladung provozierte Laminitis zu verhindern. BAILEY et al. (2002) gingen von einer vergleichbaren Wirkung des Pflanzensteroids Saponin, gewonnen aus *Yucca schidigera* aus. Dies ist aber noch zu belegen.

Das modifizierte Darmmilieu führt zur veränderten Permeabilität der Darmwand bzw. zur Diffusion von Toxine. BAILEY et al. (2003) hielten einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Aminkonzentration im Zäkum und der Pathogenese von Laminitis für wahrscheinlich. GARNER et al. (2002) gingen davon aus, dass Histamin als vasoaktives Agens den Grund für die folgende Laminitis darstellt. BAILEY et al. (2002, 2003, 2003b) vermuteten zusätzlich andere vasoaktive Amine. Laut BAILEY et al. (2004) und ELLIOTT et al. (2003) wirken Tryptamin, Tyramin und Phenylethylamin peripher vasokonstriktiv und führen zu einem Temperaturanstieg in der dorsalen Hufwand (BAILEY et al. 2004). Weiterhin beschrieben ELLIOTT et al. (2003) die Vasokonstriktion der distalen Blutgefäße über direkte und indirekte Interaktionen einiger biogener Amine mit Serotonin (5-Hydroxytryptamin) und Adrenorezeptoren. Auch CRAWFORD et al. (2007) stellten nach Fütterung von Inulin einen Anstieg vasoaktiver Amine im Kot jedoch nicht im Blut fest. Sie gingen daher davon aus, dass ein „Schwellen-pH-Wert“ existiert, ab dem die Darmwand für vasoaktive Amine und auch für Laktat durchlässig wird.

Ausschlaggebend für die Unterversorgung der Huflederhaut mit Blut könnten aber auch Endotoxine sein (GARNER et al. 1978, SPROUSE et al. 1987, ZERPA 2005). MUNGALL et al. (2002) oder REISINGER et al. (2002) belegten in diversen ex vivo- und in vitro-Untersuchungen die Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen (MMP) durch Endotoxine oder Thermolysin. POLLITT

Literatur

(1998) und FRENCH et al. (2004a) beschrieben die unkontrollierte Aktivierung von MMP's, welche unter anderem Wachstum und Reparatur des equinen Hufhorns beeinflussen. Sie diskutierten den Zusammenhang dieser Aktivitätssteigerung mit der Ablösung der Wandlerhaut des Hufes von der Oberhaut. Auch WANG et al. (2014) beschreiben diese MMP-13 Aktivierung während einer durch Kohlenhydratüberladung ausgelösten Laminitis.

Neben der Ausschwemmung von Toxinen aus dem Darm wird ein Zusammenhang von fütterungsbedingter Laminitis und Insulinresistenz diskutiert. Nach TREIBNER und KORNFELD (2006) gab es die ersten Überlegungen dazu bereits in den 1980er Jahren. Insulinresistenz ist das Versagen der Zellen, adäquat auf Insulin zu reagieren. Unterschiedliche Mechanismen werden beschrieben: eine Verminderung der Insulinrezeptoren an der Zelloberfläche, Defekte der Insulinrezeptoren, Funktionsstörungen bei intrazellulären Vorgängen, Störungen der Translokation oder Funktionsstörungen der Glukose-Transporter-Proteine (GLUT 4) (FRANK 2006). Eine gestörte Glukoseaufnahme in die Zelle und eine Hyperglycämie sind die Folgen. Mehrmals tägliche Fütterung von stärkereichen Getreiden kann die Entstehung von Insulinresistenz fördern (KRONFELD und HARRIS 2003, TREIBER et al. 2005). So beobachteten HOFFMANN et al. (2003) eine Insulinresistenz bei sehr dicken Pferden und Ponies, die Rationen mit hohen Zucker- und Stärkeanteilen erhielten. In diesem Zusammenhang spricht man von EMS (equines metabolisches Syndrom). JOHNSON (2002) stellte erstmals in der Veterinärmedizin den Kontext von Übergewicht, Insulinresistenz und Laminitis her. Alternative Namen wie PMS (prelaminitic metabolic syndrome) oder PCS (peripheral Cushing's Syndrome) konnten sich nicht durchsetzen. Leitsymptome des EMS sind laut FRANK et al. (2010) generalisiertes Übergewicht oder regionale Fettpolster an Mähnenkamm, Schulter, Schweifansatz, Präputium oder Euter gepaart mit einer Hufrehe, bei der keiner der anderen auslösenden Faktoren diagnostiziert wurde sowie einer Insulinresistenz, mit Hyperinsulinämie und abnormer glykämischer oder insulinämischer Antwort auf orale oder intravenöse Zuckerzufuhr (kombinierter Glukose-Insulin-Test (cGIT)). Schon 2000 untersuchten JOHNSON et al. den Zusammenhang der Ätiopathogenese endokriner Imbalancen, wie z.B. Cushing Syndrom, Hyperadrenokortizismus und metabolisches Syndrom mit Adipositas und Insulinresistenz. Durch die Insulinresistenz kommt es zu einer Hyperglykämie, welche eine glykotoxische Endotheliopathie mit gesteigerter Endothelin-1 (ET-1) Produktion und verminderter Freisetzung von Stickstoffmonoxid zur Folge haben kann. Laut JOHNSON et al. (2000) erklärt sich so die Konstriktion digitaler Gefäße. Auch EADES et al. (2002) beschreiben die ET-1 dosisabhängige Vasokonstriktion. ET-1 ist ein potentes vasokonstriktorisches Peptid, welches im Zusammenspiel mit anderen Entzündungsmediatoren (TGF, TNF) an den digitalen Venen eine etwa 3,5mal stärkere Gefäßverengung als an den Arterien hervorruft.

Literatur

KORNFELD et al. (2006) stellten bei Ponies mit Laminitisvorerkrankungen höhere Plasmainsulinwerte als bei der Kontrollgruppe ohne Vorerkrankung fest und schlossen demnach auf eine Insulinresistenz. Auch die Studie von ASPLIN et al. (2007) belegte, dass eine Plasmainsulinerhöhung die Auslösung von Laminitis zur Folge hat. Eine gesteigerte Plasmainsulinkonzentration wurde bei Ponies mit Laminitispredisposition im Gegensatz zu normalen Ponies auch nach Fütterung von Inulin gemessen (BAILEY et al. 2007). Ausschlaggebend im Zusammenhang mit der Entstehung von Laminitis ist demnach nicht nur die Dosis des verabreichten Inulins sondern auch erbliche bzw. erworbene Faktoren. Denn im Gegensatz zu den Arbeiten am Pferd belegten Studien (TARINI und WOLEVER 2010) an gesunden Menschen, dass die Inulinaufnahme das Risiko für Diabetes Typ II (Insulinresistenz) reduzieren könnte. Dies wurde durch die Erhöhung des Blutspiegels an kurzkettigen Fettsäuren, der Senkung von freien Fettsäuren im Blut sowie dem Einfluss auf Darmhormone, die regulierend auf die Nahrungsaufnahme wirken, erklärt. Weitere Untersuchungen (YUN et al. 2009) mit humanen Muskelzellen und Hepatozyten belegten, dass Inulin die Glukoseaufnahme in Zellen mit Insulinrestistenz fördert. YUN et al. (2009) beobachteten hier die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) und der AMP-aktivierenden Proteinkinase (AMPK), welche die Translokation des GLUT 4 (Glukosetransporter) bewirken. Weitere Studien und der Vergleich zum equinen Metabolismus sind nötig, um die insulinämischen Reaktionen von Inulin zu untersuchen.

Zusammenfassend scheint auch die fütterungsbedingte Pododermatitis diffusa aseptica ein multifaktorielles Ereignis vielschichtiger Komponenten darzustellen. Weitere Studien müssen hier Aufschluss geben.

2.4 Untersuchungsmethoden

Zur Erforschung der Verdaulichkeit von Nährstoffen, Verdauungskinetik und alimentär bedingten Krankheiten dienten klassischerweise Tierversuche. In der modernen Wissenschaft lassen sich unter dem Tierschutzaspekt jedoch immer weniger in vivo-Experimente mit der Inkaufnahme des Todes von Versuchstieren rechtfertigen. Aus dieser Überlegung heraus sowie notwendiger Zeit-, Kosten- und Arbeitersparnis wurden schon frühzeitig in situ- und in vitro-Methoden etabliert. Sie ermöglichen die Simulation der Digestion im Organismus und bieten die Möglichkeit zur teilspezifischen Untersuchung einzelner Verdauungsprozesse. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Methoden, mit Schwerpunkt auf die Erforschung der Kohlenhydratverdauung beim Pferd, vorgestellt. Ein besonderes Augenmerk soll hierbei auf Inulin liegen, da dieses Fruktan oft als Modellkohlenhydrat für eine Weidefütterung dient.

Literatur

2.4.1 In vivo-Systeme

Beim Einsatz von Inulin im Tierversuch interessieren sowohl die positiven Eigenschaften als Prebiotikum als auch die negativen Eigenschaften als Vertreter der Fruktane in Gräsern. FUKATA et al. (1999) fütterten Hühnerküken mit Fruktooligosacchariden, um eine fütterungsbedingte Reduktion der Salmonellenbesiedlung des Darms nachzuweisen. SWANSON et al. (2002) verabreichten diese Zucker in Kombination mit *Lactobacillus acidophilus* an erwachsene Hunde und bestätigten eine Modulation der Dickdarmflora, Verdauungskapazität und Zusammensetzung der Fermentationsprodukte. BRANNER et al. (2004) und BOHMER et al. (2005) untersuchten die fäkale und präzäkale Verdauung von Laktulose und Inulin mittels Ileo-Rektal-Anastomose bei Schweinen. Mittels oraler Bolusgabe von 13, 17 oder 21 g/kg Inulin an Färsen bewiesen THOEFNER et al. (2004) den Zusammenhang zur Pathogenese von Laminitis.

Zur Untersuchung von alimentär bedingter Laminitis beim Pferd dienten neben Inulin bzw. Raftilose auch Maisstärke (GARNER 1975) und schwarze Walnuss (*Juglans nigra*) (MINNICK et al. 1987, GALEY et al. 1991). FRENCH und POLLITT (2004a, 2004b) oder VAN EPS und POLLITT (2006) provozierten durch gezielte Inulingabe klinische und histologische Laminitis bei Pferden und bestätigten so deren Kontext. Auch sie beschränkten ihre Untersuchungen auf eine einmalige Gabe von 7,5 g, 10 g bzw. 12,5 g Oligofruktose/kg Lebendmasse (LM). CRAWFORD et al. (2007) untersuchten anhand von Weidefütterung, den Zusammenhang von Fruktangehalt in Gräsern und Laminitis bei Ponies. Sie simulierten gesteigerte Konzentrationen durch Verabreichung von 3 g Inulin pro kg Lebendmasse und Tag zusätzlich zur Tagesration Wiesengras. So belegten sie durch eine kontinuierliche Aufnahme dieser Kohlenhydrate eine Steigerung an Fermentationsprodukten, welche im Verdacht stehen, Laminitis auszulösen.

2.4.2 In situ-Systeme

Schon 1938 etablierte QUIN seine Nylonbeuteltechnik (in sacco Methode), um die Abbauraten und Verdaulichkeiten von Futtermitteln im Verdauungstrakt von Schafen zu messen. Hierbei werden mit Futtermittel gefüllte Nylonbeutel in den Pansen fistulierter Tiere eingebracht. Diese Technik übertrugen verschiedene Forschungsgruppen auf andere Tierarten. So verwendeten unter anderem VAN DYNE et al. (1962) und FIGROID et al. (1972) die Methode zur Verdaulichkeitsmessung bei Rindern oder GRAHAM et al. (1985) und ROBERTSON et al. (1987) bei Schweinen. APPLGATE und HERSHBERGER (1969), DE FOMBELL et al. (2004) oder PHILIPPEAU et al. (2014) modifizierten die Nylonbeuteltechnik zur Anwendung bei Pferden. Nachteile dieser

Literatur

Methoden sind die kosten- und arbeitsintensive Haltung fistulierter Tiere, die begrenzte Probenzahl pro Inkubation sowie die Tierschutzrelevanz.

2.4.3 Gasvolumenmessung

Eine Reihe weiterer Techniken (QUIN 1943, MENKE und STEINGASS 1988, BLÜMMEL und BECKER 1997) beruht auf der Tatsache, dass bei der Fermentation von Nährstoffen durch Mikroorganismen Gase entstehen. In Glaskolben oder Inkubationsflaschen werden Futtermittel und bestimmte Mengen von Inokulum meist gepuffert inkubiert. Die Behälter befinden sich im Wasserbad bei physiologischer Körpertemperatur. Der theoretische Ansatz beruht auf der Relation der messbaren Gasmenge zur Fermentationsleistung. Entscheidender Unterschied der einzelnen Systeme ist die Art und Weise, wie das produzierte Gas gemessen wird. Bei den Methoden von QUIN (1943), MC BEE (1953), EL-SHAZLY und HUNGATE (1965) oder CZERKAWSKI und BECKENRIDGE (1969 und 1970) wird das Gasvolumen mittels Manometer bestimmt. Das System von BEUVINK (1992) fußt auf Flüssigkeitsverdrängung.

Beim HFT (Hohenheimer Futterwert Test) von MENKE et al. (1979) arbeitet man mit Glaskolben mit aufgedruckter Skala, deren Stempel sich durch das entstehende Gasvolumen bewegen. Klassischerweise dient Darminhalt fistulierter Tiere als Inokulum. In der modifizierten Variante von ZEYNER et al. (2005) kommt Fäzes vom Pferd zum Einsatz. Den Einsatz von Fäzes als Inokulum begründet die Arbeitsgruppe damit, dass die Mikroorganismen des Verdauungstraktes nahezu in identischer Zahl im Kot enthalten sind. Die Vergleichbarkeit von Kot und equinem Zäkuminhalt als Inokulum bestätigen die Untersuchungen von ENGELMANN et al. (2006), obwohl Einschränkungen bei der Beurteilung substratspezifischer Effekte bestehen bleiben.

Ein von WILKINS (1974) erarbeitetes Druckübertragungssystem wurde durch diverse Modifikationen weiterentwickelt. So digitalisierten PELL und SCHOFIELD (1993) die Methode. THEODOROU et al. (1994) setzten nur ein Druckmessgerät ein, während bei CONE et al. (1996) mehrere elektrische Ventile zum Einsatz kommen, um eine kontinuierliche Überwachung der Gasproduktion pro Zeiteinheit zu ermöglichen. Als vorteilhaft erweist sich bei den genannten Methoden die Möglichkeit einer Beurteilung der Fermentationskinetik. Aufgrund der Versuchsanordnung ist allerdings kein Eingriff während der Inkubation möglich. Die Bewertung der Fermentation beschränkt sich auf die Gasproduktion und die nach Ablauf des Versuches entnommenen Proben und messbaren Parameter.

Literatur

2.4.3 In vitro-Systeme

Es existiert eine Vielzahl von in vitro-Methoden, um die unterschiedlichen Digestionsprozesse genauer zu erforschen. Die meisten Systeme setzen Fäzes oder Ingesta als Inokulum ein. Man kann die Systeme grob in Endpunkt- oder semikontinuierliche Methoden unterteilen.

2.4.4.1 Mikrobielle Systeme

TILLEY und TERRY (1963) etablierten eine mikrobielle Technik zur Simulation der Wiederkäuerverdauung, bei der nach 24-stündiger Vorinkubation mit Pansensaft eine zweite Inkubation mit Pepsin erfolgt. Diese Zwei-Phasen-Inkubation stellt allerdings eine Endpunkt-Studie dar, die keine Aussage zur Kinetik der Verdauungsprozesse zulässt. GOERING und VAN SOEST (1970) variierten diese Technik, um die wahre Trockensubstanz-Verdaulichkeit zu bestimmen. MURRAY et al. (2005) untersuchten mit geänderter Versuchsanordnung die Verdauung von Luzerne beim Pferd.

Eine weitere Möglichkeit zur Verdaulichkeitsmessung stellt der Daisy^{II}-Inkubator (Ankom® Tech., Fairport, NY, USA) dar. Dieser liefert zu den bereits erläuterten Systemen vergleichbare Ergebnisse und bietet die Möglichkeit der Messung einer großen Probenanzahl. Es werden in Filterbeutel geschweißte Futtermittel in mit Pufferlösung gefüllten Glasflaschen inkubiert. Auch dies stellt eine Endpunkt-Studie dar, die je nach Versuchsdesign nach 48 oder 72 Stunden endet. Ursprünglich für die Untersuchung der Wiederkäuerverdauung (HOLDEN 1999) konzipiert, benutzten RINGLER et al. (2005), LATTIMER et al. (2007) oder KÖPKE (2010) die Apparatur für Studien zur Pferdeverdauung.

2.4.4.2 Enzymatische Systeme

JONES und HAYWARD (1975), DOWMAN und COLLINS (1982) oder DE BOEVER et al. (1986) setzten Enzyme statt Mikroorganismen ein. Bei diesen Endpunkt-Studien wurden durch Pilze produzierte Zellulasen und Hemizellulasen verwendet (LOWMAN 1998), was den Verzicht von fistulierten Spendertieren ermöglicht. Sowohl Futtermittel für Wiederkäuer (NOUSIAINEN et al. 2003) als auch für Pferde (ZEYNER und DITTRICH 2005) wurden im enzymatischen System auf ihre Verdaulichkeit untersucht und mit der in vivo Fütterung verglichen. Die Übertragbarkeit auf physiologische Verhältnisse im Verdauungstrakt bleibt jedoch umstritten.

2.4.4.3 Rumen-, Kolon-, Zäkum-Simulation-Technik

Die Rumen Simulation Technik (RuSiTec) von CZERKAWSKI und BECKENRIDGE (1977) stellt eine Kombination aus mikrobieller Methode und Gasvolumenmessung zur Untersuchung der

Literatur

Verdauung von Wiederkäuern dar. Gegenüber den genannten Endpunkt-Systemen ist dies eine semikontinuierliche Methode. In speziellen mit Inokulum gefüllten Fermentern werden in Nylonbeutel gefüllte Futtermittel inkubiert. Dabei wird eine Pufferlösung kontinuierlich in das System geleitet und die Gasproduktion mittels Gasbeuteln gemessen. Dieses Verfahren wurde von STÜCK et al. (1995) und BENDER et al. (2001) an die Verdauung vom Schwein (CoSiTec) und von DILL et al. (2006) und ENGELMANN et al. (2007) an die Pferdeverdauung (Caesitec) adaptiert. Klare Vorteile gegenüber den bereits beschriebenen Systemen sind die Annäherung an physiologische Verhältnisse durch die ständige Zufuhr eines tierartsspezifischen Puffers. Somit sind die Simulation des Milieus im Digestionstrakt und die Inkubation über mehrere Tage sowie das Einbringen diverser Substrate und Dosierungen möglich. Langzeitstudien über mehr als 10 Tage (ENGELMANN et al. 2007) sind mit keinem anderen in vitro-System beschrieben. Als Inokulum kommen Pansensaft (CZERKAWSKI und BECKENRIDGE 1977) bzw. Koloninhalt (STÜCK et al. 1995, BENDER et al. 2001), Zäkuminhalt oder Fäzes (DILL et al. 2007, VOSMER et al. 2012) zur Anwendung. Für die Bewertung der Fermentation stehen vielfältige Parameter zur Verfügung. Mittels Probennahme im laufenden Versuch kann man zusätzlich zur Fermentationskinetik Erkenntnisse über die Milieuveränderungen (pH-Wert, Gas- und Fettsäurezusammensetzung, L-, D- Laktat, Ammoniak, mikrobiologische Verschiebungen) ziehen (ENGELMANN et al. 2007). Das System kann somit umfassend überwacht und ausgewertet werden und stellt für die vorliegende Fragestellung das Mittel der Wahl dar.

Zusammenfassung

2.5 Zusammenfassung

Das Pferd ist aufgrund seiner Entwicklung als herbivorer Steppenbewohner an eine rohfaserreiche Ernährung adaptiert. Durch konzentratreiche Fütterung oder jahreszeitliche Schwankungen der Nährstoffzusammensetzung der Weidegräser unserer Breiten kann es zu einer Überlastung der präzökalen Verdauung und somit Anflutung leicht verdaulicher Kohlenhydrate im Dickdarm kommen. Dies bewirkt eine Senkung des pH-Wertes und Verschiebung der Bakterienflora mit verändertem Metabolitenprofil im Chymus. Mögliche Folgen sind Darmwandschäden und Ausschwemmung von Toxinen und vasoaktiven Stoffen sowie die Übersäuerung des Organismus. Aus diesen Veränderungen heraus resultieren verschiedene Begleiterkrankungen. Eine viel untersuchte Folge dieser Fehlernährung ist die Hufrehe.

Zahlreiche Tierversuche verfolgten das Ziel, genaueren Aufschluss über den Zusammenhang einer Darmmilieuentgleisung und den Veränderungen in der Mikrozonulation des Hufapparates, welche Laminitis auslösen, zu liefern.

Dabei kamen immer wieder Inulin oder Raftilose als Vertreter der Fruktane zum Einsatz. Diesen leicht fermentierbaren Speicherkohlenhydraten der Gräser wird eine große Rolle in der Ätiologie von alimentär bedingter Laminitis zugeschrieben. Denn wie zahlreiche Studien belegten, schwankt die Konzentration dieser Kohlenhydrate in der Pflanze sowohl in Abhängigkeit des Tagesrhythmus als auch der Jahreszeit erheblich. Einflüsse hierfür stellen sogenannte Stressoren wie Temperatur, Lichtintensität, Wasserverfügbarkeit und Fertilisation oder Düngung und Stickstoff-Verfügbarkeit dar. Bei erhöhten Fruktankonzentrationen im Weidegras kommt es zu einer Überschreitung der präzökalen Verdauungskapazität und Anflutung dieser leicht fermentierbaren Kohlenhydrate im equinen Dickdarm. Wie Fruktane genau zur Entstehung von Laminitis beitragen, ist noch nicht vollständig geklärt.

Daher wurden unterschiedlichste in vitro-Methoden zur Erforschung der Fermentationsdynamik nach Überladung mit Fruktanen genutzt. Die in der Literatur bisher beschriebenen Methoden stellen Endpunktsysteme dar. Diese liefern zeitlich eingeschränkte Aussagen und eine Übertragbarkeit auf physiologische Verhältnisse ist aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Beurteilung kontinuierlicher Prozesse kritisch zu bewerten.

Hypothese

2.6 Hypothese

Aus der vorliegenden Literatur wird die folgende Hypothese hergeleitet.

Die Verschiebung der Mikroflorazusammensetzung und Fermentationsdynamik des equinen Zäkums nach übermäßigem Verzehr von Weidegrasfruktanen kann mittels Raftilose auch in vitro simuliert werden. Die zäkale Azidose, Veränderung des bakteriellen Speziesprofils sowie die Bildung schädlicher Metaboliten während der Entstehung einer durch Fütterung induzierten Dysbiose sind anhand der Messungen verschiedener Parameter im Laborexperiment nachvollziehbar. Aufgrund der semikontinuierlichen Eigenschaften erscheint die Caesitec-Methode als besonders geeignet für eine solche Simulation und überzeugt im Vergleich zum Hohenheimer Gasbildungstest.

2.7. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung der Einflüsse einer fruktanreichen Fütterung auf die Fermentationsprozesse und das Milieu des equinen Zäkums. Dabei soll unter Verwendung des semikontinuierlichen in vitro-Systems Caesitec die Wirkung von Oligofruktose (Raftilose) als Substrat untersucht werden. Besonderes Interesse gilt den kurzzeitigen Effekten nach einer Einmalgabe des Konzentrates. Die Aussagen aus der Caesitec- Methode sollen mit den Ergebnissen einer HGT- Studie verglichen werden. Des Weiteren interessieren die Veränderungen bei erneuter Provokationsfütterung im Caesitec. Zur Einschätzung der Fermentationsdynamik sollen folgende Parameter beurteilt werden: pH-Wert, Gasvolumen, Gaszusammensetzung, flüchtige Fettsäuren, Ammoniak, D- und L-Laktat sowie Endotoxinkonzentration.

Material und Methoden

III Material und Methoden

Im folgenden Teil der Arbeit werden der genaue Ablauf der Experimente sowie die statistische Auswertung der Studie erläutert.

3.1 Versuchsaufbau

Zur Bearbeitung der Studie wurden die in vitro-Systeme Caesitec und Hohenheimer Gasbildungstest genutzt. In beiden Systemen diente Heu mittlerer Qualität als Grundfuttermittel und Raftilose als Konzentrat.

3.1.1 Versuchsdesign

Es wurden 3 Caesitec-Versuche mit einer Dauer von jeweils mindestens 9 Tagen durchgeführt. Hierbei wurden 3 Probenfermenter in Versuch 2 und 3 sowie 2 Probenfermenter in Versuch 1 (Rafti 1-8) parallel mit Inokulum, gewonnen aus Zäkuminhalt frisch geschlachteter Pferde, befüllt. In diesen Fermentern wurde an allen Versuchstagen Heu (8 g) und nach einer 5-tägigen Einstellphase an Tag 5 und 7 zusätzlich Raftilose (16 g) inkubiert. Als Kontrolle dienten Fermenter (Blind 1-3) mit gleichem Inokulum aber ausschließlicher Heuinkubation (8 g). Die Verwendung der einzelnen Fermenter und deren Bezeichnung sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 4: Fermenterbezeichnung und –verwendung

	FERMENTER 1	FERMENTER 2	FERMENTER 3	FERMENTER 4
Fütterung	Konzentratgabe	Konzentratgabe	Konzentratgabe	Kontrollfermenter
Versuch 1	Rafti 1	Rafti 2	-	Blind 1
Versuch 2	Rafti 3	Rafti 4	Rafti 5	Blind 2
Versuch 3	Rafti 6	Rafti 7	Rafti 8	-
Versuch 4				Blind 3

Ausschlaggebend für die zweite Raftilosegabe sollte eine Angleichung der Parameter an die Ausgangswerte vor Konzentratgabe, als Vergleich zur wiederhergestellten Normalflora, sein. In Versuch 1 erfolgte die Wiederholungsgabe an Tag 8. Nach Untersuchung und Vergleich

Material und Methoden

der Parameter (siehe Anhang Tab. A 01) 48 und 72 Stunden nach Raftilosegabe, erfolgte die Konzentratgabe in den folgenden Versuchen an Tag 7. Der Ablauf der Fütterung kann in Tabelle 5 nachvollzogen werden.

Tab. 5: Fütterung der Caesitec- Fermenter

FERMENTER	VERSUCHSTAG						
	<i>Schlachttag</i>	1- 4	5	6	7	8	9
Rafti 1, 2 (Versuch 1)	Heu	Heu	Heu+ 1.Raftilose- gabe	Heu	Heu	Heu+ 2.Raftilose- gabe	Heu
Rafti 3- 8 (Versuch 2, 3)	Heu	Heu	Heu+ 1.Raftilose- gabe	Heu	Heu+ 2.Raftilose- gabe	Heu	Heu
Blind 1- 3 (Kontrolle)	Heu	Heu	Heu	Heu	Heu	Heu	Heu

Zu jedem Start eines Caesitec-Versuches wurde parallel ein Hohenheimer Fermentationstest/ Gasbildungstest (HFT bzw. HGT) durchgeführt. Die Inokula beider in vitro-Systeme wurden zeitgleich aus identischem Zäkummaterial hergestellt. Die HGT-Inkubationszeit betrug durchschnittlich 25 Stunden. Auch bei dieser Methode wurden als Kontrolle Kolben inkubiert, die lediglich mit Heu und Inokulum befüllt waren.

3.1.2 Versuchstiere

Der für die Versuche verwendete Zäkuminhalt stammte von Tieren, die in kommerziell wirtschaftenden Schlachtbetrieben geschlachtet wurden. Die Pferde wurden bis zum Schlachttag privat gehalten, waren männlich kastriert und zwischen 7 und 19 Jahre alt. Alle Tiere waren Deutsche Reitpferde mit einem Gewicht von 500 bis 600 kg LM. Durch Befragung des Schlachtpersonals und Einsicht in den Equidenpass konnten Daten zu Geburtsjahr, Schlachtgrund und Fütterung (siehe Anhang Tab. 2) erfasst werden. Laut Anamnese wies keines der Tiere Verdauungsprobleme auf.

Material und Methoden

3.1.3 Substrate

Es wurden die Substrate Heu und Raftilose (Boneo™ P95; ORAFTI SA, Belgien) verwendet.

3.1.3.1 Heu

Als Grundfuttermittel diente hygienisch einwandfreies Wiesenheu mittlerer Qualität (siehe Tab. 6). Für die Caesitec-Inkubation wurde es mittels Futtermittelmühle (Cyclotec 1093 sample mill, tecator) auf eine Partikelgröße von 355 µm bis 10 000 µm gemahlen und ausgesiebt. Die kalorimetrische Untersuchung im eigenen Labor (Institut für Tierernährung, Diätetik und Ernährungsschäden, Leipzig, Germany) ergab für das verwendete Heu einen Brennwert von 16808 J/g bzw. 16,8 MJ/kg. Die Einwaage an Heu im Caesitec richtete sich nach den limitierenden Faktoren des begrenzten Innenvolumens des Nylonbeutels und der Mahlfeinheit des Substrates. Denn für die Inkubation musste eine gleichmäßige Durchsaftung des Substrates im Nylonbeutel sichergestellt werden. Dies war nur bei nicht zu fest gepresstem Substrat realisierbar. Aus diesen Gründen resultierte eine tägliche Ration von 8 g gemahlenem Heu pro Fermenter.

Für den HGT wurden 50 mg Heu pro Kolben als Substrat eingewogen, dessen Mahlfeinheit bei $\leq 355 \mu\text{m}$ lag.

Tab.6: Nährstoffgehalt des verwendeten Wiesenheus nach Weender- Analyse

Rohnährstoffe	in oS (%)
Trockensubstanz TS	93,00
Rohasche Ra	10,63
Rohprotein Rp	8,70
Rohfaser Rfa	24,86
Rohfett Rfe	0,98
NfE	47,83
organische Substanz	82,37
Stickstoffgehalt N	1,39
NDF	51,84
ADF	28,44
Zellulose	25,46
Lignin	2,98

Material und Methoden

3.1.3.2 Raftilose – Beneo™ P 95

Zur Simulation der Kohlenhydratüberladung im Dickdarm kam Raftilose (Beneo™ P95; ORAFTI SA, Belgien) zum Einsatz. Die Substanz besteht zu 93 % aus Oligofruktose (β -2,1-Bindung), welche aus der Chicoréewurzel gewonnen wurde. Die Partikelgröße des feinen Raftilosepuders wird laut Hersteller als $< 60 \mu\text{m}$ (max. 10%) und $> 165 \mu\text{m}$ (mind. 20 %) beschrieben. Der Polymerisationsgrad, also die Anzahl der Monomere im Polymermolekül, wird mit zwischen 2 und 8 angegeben. Die detaillierte Charakterisierung nach Herstellerangaben ist dem Anhang (Tab. 3) zu entnehmen. Laut eigener kalorimetrischer Untersuchung weist Raftilose einen Brennwert von 16136 J/g bzw. 16,1 MJ/kg auf.

Die als Konzentrat im Caesitec eingesetzte Menge an Raftilose (16g) resultiert aus Voruntersuchungen. Sie entspricht 2/3 einer Gesamtration von 24 g Futtermittel (8g Heu und 16 g Raftilose) und ist nötig, um eine Absenkung des pH-Wertes unter 5 zu erreichen.

Bei der Annahme ein Pferd besitzt ca. 1,5 g Zäkuminhalt pro kg LM und 7,5 g Inulin pro kg LM (POLLITT und VAN EPS 2002) sind nötig, um sicher bei einem Pferd Hufrehe auszulösen, wäre die Konzentration im Zäkum also 0,5 g Inulin pro ml Zäkumflüssigkeit oder 500g/l. Überträgt man dies auf ein Fermenterinnenvolumen von 700 ml Flüssigkeit, bräuchte man 350 g Inulin. Im Fermenter ist ein kompletter Flüssigkeitsaustausch nur 1x pro Tag möglich. Dies resultiert aus dem großen Materialaufwand bei einem hohen Auswaschungsgrad. Gleicht man die Menge Inulin dem zum nativen Zäkum 10 mal geringerem Flüssigkeitsaustausch an, ist eine Menge von 35 g nötig, um die Entgleisung herbeizuführen. Die Pufferkapazität des verwendeten Puffers entspricht der Hälfte der Kapazität von nativem Zäkuminhalt. Nach Abgleich bleibt eine Inulinmenge von 17,5 g zur Entgleisung des Milieus. Nach Voruntersuchungen zur Löslichkeit des Konzentrates und resultierend aus den Überlegungen einer Rationsgestaltung ergab sich eine Inulinmenge von 16 g zu einer Heumenge von 8 g.

Beide Futtermittel wurden für die Inkubation im Caesitec portioniert und mit γ -Strahlung (Gamma-Service Produktstrahlung GmbH, Radeberg, Germany) gemäß EN552/ISO 1137 bei 25 kGy bestrahlt. Diese Bestrahlung sollte den Fremdeintrag von Keimen in das Inkubationssystem minimieren, um einer Verfälschung der Ergebnisse vorzubeugen. Die Aufbewahrung der Substrate erfolgte in verschlossenen Folienbeuteln bei Zimmertemperatur.

Im HGT kamen die gleichen Futtermittel zur Anwendung. Um eine eventuelle Keimbelastung zu reduzieren, wurden sowohl Raftilose als auch Heu bis zur Verwendung im HGT in Folienbeuteln portioniert bei $- 20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Als Konzentrat diente im HGT 12,5 mg Raftilose pro Kolben.

Material und Methoden

3.1.5.2 HGT (Hohenheimer Gasbildungstest)

Im Hohenheimer Gasbildungstest werden Glaskolben als Inkubationsgefäß verwendet. Diese werden mittels Schüttelapparatur bei konstanter Temperatur (39°C) in einem Thermoschrank in ständiger Bewegung gehalten. Die Kolben sind durch eine auf einem gasdichten Schlauch befestigte Schlauchklemme und einem gefetteten Glasstempel verschlossen. Das Inokulum stellt ein Gemisch aus Puffer und von Pferden entnommenem Zäkuminhalt (siehe Kap.3.2.7) dar. Durch die Inkubation von Substrat und Inokulum entsteht Gas, welches den Kolbenstempel aus dem Glaskolben bewegt. Auf der Skalierung des Kolbens kann man diese Volumenzunahme ablesen. Zur Veranschaulichung ist im Folgenden (Abb. 2) ein HGT-Glaskolben abgebildet.

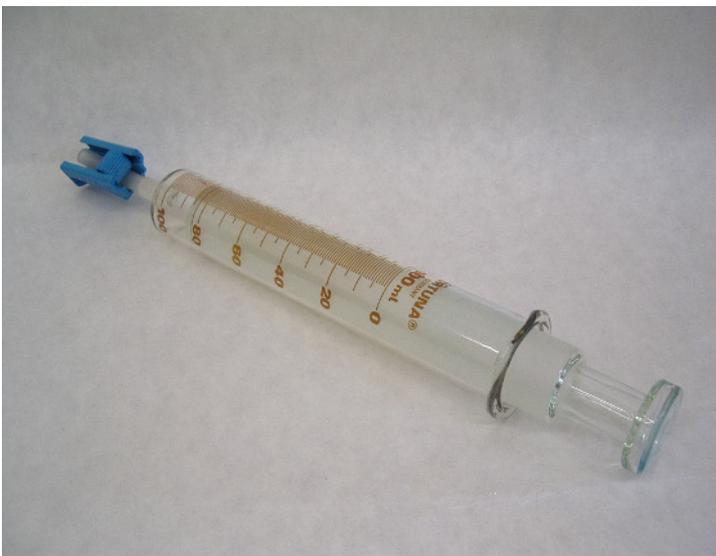


Abb. 2: Inkubationskolben für HGT
(Foto Engelmann 2005)

3.1.6 Chemikalien

Eine Liste aller verwendeten Chemikalien ist im Anhang enthalten.

3.2 Versuchsdurchführung

Zu Versuchsbeginn wurden zeitgleich Caesitec-Inkubation und HGT gestartet. Das Material für die Inokula beider Systeme stammte vom Zäkuminhalt des gleichen frisch geschlachteten Pferdes. Aus Gründen der Verständlichkeit soll in den folgenden Ausführungen auf beide in vitro-Systeme getrennt eingegangen werden.

3.2.1 Ablauf Caesitec

Die Methode wurde nach Vorgaben von ZEYNER et al. (2007) durchgeführt.

Material und Methoden

Vorbereitung des Caesitec´s

Die Vorbereitung der Caesitec-Inkubation unterteilte sich in Desinfektion der Apparatur, Kontrolle der verwendeten Beutel und Pufferherstellung. Für die Herstellung der Caesitec-Pufferlösung kamen folgende Chemikalien (Tab. 7) zum Einsatz.

Tab. 7: Chemikalien für Caesitec- Pufferlösung

CHEMIKALIE	EINWAAGE IN G PRO 1000 ML
NaCl	0,82
KCl	1,04
Na ₂ SO ₄	0,28
KH ₂ PO ₄	0,88
NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	0,97
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,15
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,2
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1,51
CH ₄ N ₂ O	0,24
NaHCO ₃	5,63
NH ₄ HCO ₃	0,63

Bei der Herstellung der Pufferlösung (ENGELMANN et al. 2007) waren insbesondere die Reihenfolge der Mischung der Chemikalien sowie die Begasung mit Spezialgas (siehe Anhang) wichtig. Mittels Pufferpumpe wurde eine konstante Zufuhr des Spezialpuffers in die Fermenter gewährleistet. Der komplette Flüssigkeitsaustausch wurde durch Zuleitung von 800 ml Pufferflüssigkeit in 24 Stunden erreicht.

Inkubation im Caesitec

Die Gewinnung des Zäkuminhaltes erfolgte durch Eröffnung an der Zäkumspitze. Mittels Filtration des Inhaltes durch eine ausgekochte Gaze (RILON-Milchsehtuch, Dresden, Germany) konnten Fest- und Flüssigphase getrennt gewonnen werden. Diese Gaze besaß eine Porengröße von ca. 4 µm bzw. 11000 Maschen je cm².

In jedem Fermenter wurden 600 ml flüssiger Zäkuminhalt sowie 100 ml Puffer gemischt und zwei Nylonbeutel, mit einer Porenweite von 100 µm, in den perforierten Fermentationbehälter verbracht. Beutel 1 enthielt als Substrat 8 g Heu. Beutel 2 war befüllt mit 30 g der Festphase des Zäkuminhaltes, welche als Mikrobenreservoir diente. Nach 24-stündiger Inkubation, in

Material und Methoden

der die Anheftung der Mikroben an das Substrat im Nylonbeutel 1 erfolgt war, wurde Beutel 2 mit Zäkumfestphase gegen einen frischen Substratbeutel (8 g Heu) ausgetauscht. Jeweils nach 24 h Inkubation wurde der Nylonbeutel, welcher sich 48 h im System befunden hatte, durch einen mit frischem Substrat befüllten Beutel ersetzt. An den Tagen 5 und 7 wurden zusätzlich 16 g Raftilose in der ausgedrückten Beutelflüssigkeit des entnommenen Beutels gelöst und dem Fermenter zugeführt. Nach dem täglichen Beutelwechsel erfolgte die Begasung mit 1 Liter Spezialgas um wieder anaerobe Bedingungen zu schaffen

3.2.2 Ablauf *Hohenheimer Gasbildungstest (HGT)*

Das Vorgehen entspricht einer Modifikation der Methode im Methodenbuch III, 2. Erg. 1988, Futtermitteluntersuchung: Netto-Energie-Laktation/HFT 25.1. Das veränderte Vorgehen ist im Folgenden dargestellt.

Vorbereitung des HGT's

Die Vorbereitung der HGT-Inkubation ist in Desinfektion der Apparatur, Substrateinwaage und Pufferherstellung zu untergliedern. Die Herstellung der HGT- Pufferlösung erfolgte nach Methodenbuch III, 2. Erg. 1988, Futtermitteluntersuchung: Netto-Energie-Laktation/HFT 25.1. Die Liste der dazu nötigen Chemikalien ist dem Anhang (9.3.2.4 Puffer) zu entnehmen. Es wurden pro HGT zwei Verfahren zur Herstellung von Inokulum durchgeführt:

1. 'Inokulum fest'

Hierbei wurden im Mischungsverhältnis 1:6 also 73,77 g Zäkumfestphase und 450 ml HGT-Puffer in einem vortemperierten Gefäß (39°C) gemischt und mit CO₂ begast.

2. 'Inokulum flüssig'

Hier lag ein Mischungsverhältnis von 1:2 zugrunde. Demnach wurden in einem temperierten Gefäß (39°C) 180 ml Zäkumflüssigphase mit 360 ml Puffer gemischt und CO₂-begast.

In jeden Kolben wurden pro Inokulumvariante (je 30ml) entsprechend Inokulumblindwerte, Einzelsubstrate (Heu: 50 mg; Raftilose: 12,5 mg) und die Substratkombination eingewogen (Tab. 8). Als Substratblindwerte wurden 4 Kolben (2x Heu, 2x Raftilose) mit reinem HGT-Puffer befüllt.

Material und Methoden

Tab. 8: Kolbenbefüllung

INOKULUM	SUBSTRAT	KOLBENANZAHL	BEZEICHNUNG
-	Heu	2	BW H
-	Raftilose	2	BW R
flüssig	-	2	BW flüssig
flüssig	Heu	3	flüssig H
flüssig	Heu + Raftilose	3	flüssig H+R
fest	-	2	BW fest
fest	Heu	3	fest H
fest	Heu + Raftilose	3	fest H+R

Inkubation im HGT

Zeitgleich wurden Caesitec und HGT gestartet. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank mit Schüttelapparatur (Schüttel: Heidolph Promax 2020; Schüttelaufsatz: Leipzig) bei kontinuierlicher Bewegung und 39°C. In regelmäßigen Abständen (ca. alle 3 h) erfolgte das Ablesen der gebildeten Gasmenge. Nach Ablauf der Inkubation wurden Gas und Kolbenflüssigkeit gewonnen und zur Probenanalyse weiterverarbeitet (siehe 1.9.1 Probenahme und Probenaufbereitung). Die Endzeit der HGT-Untersuchungen differiert aus arbeitsorganisatorischen Gründen (HGT I: 18 h; HGT II: 26 h; HGT III: 23 h). Zur statistischen Auswertung wurden nur gleiche Zeitintervalle herangezogen und eine Endzeit von 18 Stunden festgesetzt, da davon ausgegangen wurde, dass es nach dieser Inkubationszeit zu keinen Änderungen der Parameter kam.

3.3 Proben und Analyse

Im Folgenden werden die Art der Probennahme und die Verfahren der analytischen Methoden beschrieben.

3.3.1 Probenahme und Probenaufbereitung

Aufgrund der Verständlichkeit wird bei der Beschreibung der Probennahme getrennt auf Caesitec und HGT eingegangen.

Material und Methoden

3.3.1.1 Caesitec

Vor Beginn der Caesitec-Studie wurden Proben des Darmgases und der Inkubationsflüssigkeit entnommen. Während der Inkubation wurden im 24-Stunden-Abstand jeweils vor der Substratgabe pH-Wert und Redoxpotential gemessen sowie die Fermenterflüssigkeit und das produzierte Gas beprobt. Die gewonnene Flüssigkeit wurde 10 Minuten bei 15000 U/min und 4°C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in Tubes (1 ml) bei –20°C eingefroren.

Resultierend aus einer engmaschigen pH-Wert-Überwachung (siehe unten: Vorversuch zur Caesitec-Studie) und Beobachtungen der Fermentationsdynamik in Versuch 1, wurden in Versuch 2 und 3 zusätzlich an den Tagen der Konzentratgabe (T5, T7) 12 Stunden postprandial Proben der Fermenterflüssigkeit entnommen.

Vorversuch zur Caesitec-Studie: *frequente pH-Messung nach Raftilosegabe im Caesitec*

Zur Bestimmung des pH-Wert-Tiefpunktes nach Konzentratgabe wurde im Versuch 1 eine zusätzliche Beprobung durchgeführt (siehe Tab. 9: postprandiale Probenahme und pH-Messung). Über einen flexiblen Schlauch, der vom Probenahmeventil ins Fermenterinnere führte, konnte Flüssigkeit mittels Spritze (5 ml) gewonnen werden.

Tab. 9: zusätzliche Probenahme und pH-Messungen in Stunden postprandiale (h ppr)

VERSUCH	PH-MESSUNG (H PPR)	PROBENAHEME (H PPR)
1	Tag 8: 3, 6, 9, 18, 22, 24, 30, 44 h	-
2	Tag 5: 3, 6, 9, 12, 24 h Tag 7: 3, 6, 12, 24 h	Tag 5: 9, 12 h Tag 7: 12 h
3	Tag 5/ 7/ 8: 12 h	Tag 5/ 7/ 8: 12 h

Zur Auswertung gelangten nur gleiche Messzeiten bzw. –intervalle (3, 6, 12, 24, 48 h ppr.). Die Ergebnisse dieser Zusatzmessungen sind im Anhang Tab. 4 aufgelistet.

3.3.1.2 HGT

Die Gasbildung wurde in frequenten Zeitabständen (Tab. 10: Ablesezeiten für Gasvolumenmessung) ermittelt. Am Ende der Inkubation erfolgte die Gewinnung des produzierten Gases mittels Einmalspritze (5 ml) und LUER-Aufsatz über den gasdichten Schlauch am Kolben. Bis zur Analyse wurden die Gasproben im Kühlschrank bei 4- 8 °C aufbewahrt.

Material und Methoden

Tab. 10: Ablesezeiten für Gasvolumenmessung

HGT	ABLESEZEITEN (H NACH INKUBATIONSSTART)
I	3; 6; 18; (26; 29)
II	3; 6; (8,5); 18; (21; 24)
III	3; 6; (9); 19; (20)

() nicht für statistische Auswertung genutzte, zusätzliche Ablesezeiten

Die Flüssigkeit im HGT-Kolben diente der Probenbestimmung (Endotoxine, flüchtige Fettsäuren, L-Laktat, D-Laktat, Ammoniak) und wurde zu diesem Zweck sofort nach Gewinnung 10 Minuten bei 15000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der nun abpipettierte Probenüberstand konnte bis zur Analyse bei – 20°C eingefroren werden.

3.3.2 Analytische Methoden

Im Folgenden werden die Methoden zur Analyse der Futtermittel und Inokula sowie der Fermentationsprodukte und der Gasentwicklung während der Versuche beschrieben.

3.3.2.1 Trockensubstanz und Roh Nährstoffgehalt

Die Substrate und der verwendete Zäkuminhalt wurden einer Futtermittelanalyse nach Weender gemäß VDLUFA Sachsen, Methodenbuch Band III (Neumann und Bassler 1996) unterzogen. Außerdem wurde eine Mineralstoffanalyse nach den Leitlinien der VDLUFA Sachsen (LUFA, Leipzig) durchgeführt.

Das Heu wurde vor der Untersuchung in einer Futtermühle auf $\leq 100 \mu\text{m}$ gemahlen. Der Zäkuminhalt wurden getrocknet (Umlufttrockenschrank, ca. 48 h) und ebenfalls auf $\leq 100\mu\text{m}$ gemahlen.

Zur Bestimmung der Trockensubstanz (TS) wurde die Probe gewogen und nach drei Stunden Trocknung bei 103°C im Trockenschrank (Typ T 6030; Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf, Germany) im Exsikkator gekühlt und erneut gewogen.

Die Rohasche (RA) wurde durch sechs- bis siebenstündige Veraschung im Muffelofen bei 600°C ermittelt. Nach einstündigem Abkühlen im Exsikkator erfolgte die Auswaage.

Aus der Differenz von Trockensubstanz und Rohasche errechnet sich die organische Substanz (oS) mit der Formel:

$$\text{oS} = \text{TS} - \text{Ra}$$

Material und Methoden

Die Stickstoffbestimmung (N) wurde mit Hilfe eines Makroanalysators (Makro N, Fa. ELEMENTAR ANALYSENSYSTEME GmbH, Hanau, Germany) durchgeführt.

Hierbei wurden die Proben durch oxidative Verbrennung in einer mit Sauerstoff angereicherten Kohlendioxidatmosphäre aufgeschlossen und quantitativ umgesetzt. Die dabei entstehenden Stickoxide wurden an einem Kupferkontakt zu elementarem Stickstoff reduziert. In einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor wurde der Stickstoff gegen das Referenzgas Kohlendioxid quantitativ analysiert. Durch Multiplikation mit dem Faktor 6,25 wurde über den Stickstoffgehalt der Rohproteingehalt (Rp) ermittelt.

Die Bestimmung des Rohfettes (Rfe) erfolgte mittels Soxhlettapparatur (Soxtec-Gerät, Fa. FOSS, Rellingen, Germany). Nach 30-minütigem Kochen mit Salzsäure wurde das Fett mit Hilfe von Petrolether extrahiert.

Der Rohfasergehalt (Rfa) wurde mit folgendem Verfahren mittels Fibertec Systems (Hot Extractor 1020 Fa. TECATOR AB, Höganäs, Schweden) ermittelt. Die Probe wurde mit 1,25%iger Schwefelsäure über 30 Minuten gekocht und anschließend filtriert. Der Filtrationsrückstand wurde danach mit 150 ml 1,25%iger Kalilauge gekocht und abermals filtriert. Nach zweimaligem Waschen mit Aceton wurde die Probe bei 105°C getrocknet und zur Ermittlung des Rohfaser Trockengewichtes gewogen. Danach erfolgte die Veraschung bei 500°C über drei Stunden im Muffelofen. Nach Abkühlung im Exsikkator wurde der Rückstand erneut gewogen. Durch Subtraktion des Rohaschewertes vom Rohfaser Trockengewicht wurde der Rohfasergehalt ermittelt.

Die Stickstofffreie Extraktstoffe (NfE) errechnen sich aus den oben erfassten Parametern nach folgender Formel:

$$\text{NfE [\% der TS]} = \text{TS} - (\text{Ra} + \text{Rfe} + \text{Rfa} + \text{Rp})$$

Zur Bestimmung des Gehaltes an Saure Detergensfasern (ADF; acid detergent fiber), Neutrale Detergensfasern (NDF; neutral detergent fiber), Lignin (ADL; saures Detergens-Lignin) und Zellulose diente das Fibertec System (Hot Extractor 1020 Fa. TECATOR AB, Höganäs, Schweden).

Zur Analyse der Mineralstoffe nach VDLUFA Sachsen, Methodenbuch Band III wird zunächst die Rohasche in verdünnter Säure gelöst. Im weiteren Verlauf wurden Natrium (Na) und Kalium (K) flammenphotometrisch und Phosphor (P) photometrisch analysiert. Zur Bestimmung von Kalzium (Ca), Magnesium (Mg), Kupfer (Cu), Zink (Zn) wurde die Methode der Atomabsorptionsspektroskopie angewendet.

Material und Methoden

3.3.2.2 Bestimmung der Titrationsazidität

Die Titrationsazidität wurde unter Verwendung einer 0,01 molaren Salzsäure gemessen. Dafür wurde ein Zäkumflüssigkeit-Wasser-Gemisch oder Kot-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 hergestellt. Die Messung erfolgte nach 60 Minuten im zentrifugierten Überstand. Vom tatsächlichen pH-Wert wurde auf pH 6 (TA1) und weiter bis pH 5 (TA2) titriert. Die Titrationsazidität wurde in mmol/l angegeben.

3.3.2.3 pH-Wert-Bestimmung

Die pH-Wert-Bestimmung erfolgte mittels elektronischer pH-Einstabmesskette (VEB Präcitronic Dresden GBR; MV 88 Präzisions-Labor-pH-Messgerät). Die Wirkungsweise beruht auf der Bildung eines vom pH-Wert der Messlösung abhängigen Redoxpotentials. Gemessen wird dieses Potential zwischen einer Lösung mit konstanter Oxonium-Ionen-Konzentration im Inneren der Elektrode und der Messlösung. Die Eichung des Gerätes erfolgte mit genormten pH-Pufferlösungen (pH 7.01 und pH 4.01) in frequenten Abständen.

3.3.2.4 Redoxpotential

Mittels Redox-Elektrode (VEB Präcitronic Dresden GBR; MV 88 Präzisions-Labor-pH-Messgerät) konnte das Redoxpotential bestimmt werden. Dies diente zur Überwachung des anaeroben Milieus.

3.3.2.5 Pufferüberlauf

Der Überlauf des Caesites-Puffers jedes einzelnen Fermenters wurde täglich mittels Messzylinder gemessen. Dies diente der Kontrolle der Pumpenleistung und der Pufferzufuhr.

3.3.2.6 Fettsäurezusammensetzung

Das Muster flüchtiger kurzkettiger Fettsäuren wurde am SHIMADZU GC 14A Gaschromatographen nach der von ZEYNER et al. (2004) beschriebenen Methode untersucht. Bei der Bestimmung der Fettsäuren erfolgte die qualitative und quantitative Erfassung von Essigsäure, Propionsäure, iso-Buttersäure, Buttersäure, iso-Valeriansäure, Valeriansäure, Capronsäure auf Grund unterschiedlicher Größe und Verzweigungsgrad der Säuren in einer FFAP-Trennsäule (15 m*0,25 mm, Supelco, SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Taufkirchen).

Probenaufbereitung

500 µl des Überstandes der zentrifugierten Probe wurden mit 50 µl Inneren Standard (500 mg

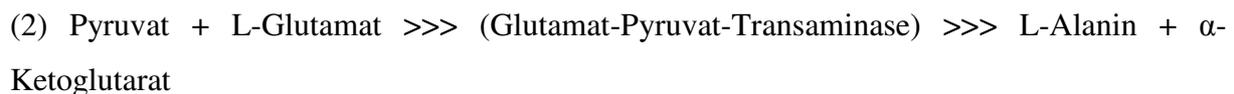
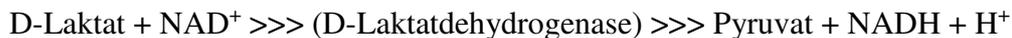
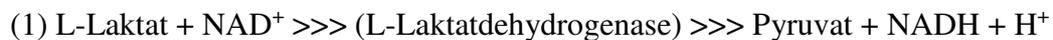
Material und Methoden

iso-Caprone (4-Methylvaleriansäure)) in 100 ml 70 % iger Ameisensäure gemischt (3 x 5 Sekunden Vortex) und anschließend 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. In den Gaschromatographen wurden 1,0 µl des gewonnenen Überstandes injiziert.

3.3.2.7 D- und L-Laktat

Die Bestimmung von D- und L-Laktat erfolgte mittels Extinktionsveränderung nach enzymatischer Dehydrierung von Laktat zu Pyruvat (BERGMEYER 1970). Die Reaktion findet in einer Glycylglycin-Pufferlösung (0,6 M Glycylglycin-Puffer, 0,1 M Glutaminsäure) bei einem pH- Wert von 10 statt. Damit die Laktatkonzentration der Probe konstant blieb, wurde vorweg eine Proteinfällung mittels Perchloroessigsäure durchgeführt. Für die Berechnung der Aktivität mussten später Fällung und Verdünnung berücksichtigt werden. Die Umsetzung von L-Laktat zu Pyruvat erfolgte durch das Enzym L-Laktatdehydrogenase (L-LDH). Diese Reaktion fand unter Reduktion von NAD^+ zu NADH statt. Dabei kam es zur Erzeugung eines messbaren Signals bei 340 nm (E1), mit dessen Hilfe eine quantitative Berechnung ermöglicht wurde. Nach 30 Minuten konnte durch enzymatische Endpunktbestimmung die Metabolitkonzentration ermittelt werden (E2).

Zur Förderung des Ablaufes einer vollständigen Reaktion wurde das gebildete Pyruvat mittels Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und L-Glutamat aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt.



Berechnung von L-Laktat

$$\Delta E_{\text{L-Laktat}} = E2 - E1$$

$$\text{Konzentration } c = (\Delta E * V * 1000) / (\epsilon * d * v) \quad [\text{mmol/l}]$$

V = Küvettenvolumen

1000 = Umrechnungsfaktor

ϵ = Extinktionskoeffizient (für NAD^+ bei 340 nm = 6,3 $\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$)

d = Schichtdicke

v = Probenvolumen

Aufgrund der L-LDH- und D-LDH-Spezifität bei Einzelbestimmung war es möglich im gleichen Reaktionsansatz die D-Laktat-Konzentration zu ermitteln.

Material und Methoden

Die Gesamtlaktatkonzentration errechnet sich aus der Addition von D- und L-Laktat.

3.3.2.8 Ammoniak

Die Ammoniakbestimmung erfolgte nach Modifikation des Mikrodiffusionsverfahrens von CONWAY (1962) nach VDLUFA-Vorschriften, Methodenbuch Band III, 4.8.1, amtliche Methode. Hierbei erfolgte die Trennung der im Medium vorhandenen flüchtigen, stickstoffhaltigen Basen durch Mikrodiffusion mittels Unterschichtung mit Kaliumcarbonatlösung. Nach 48 Stunden Reaktionszeit konnte der in Borsäure aufgefangene Ammoniak mittels Titration mit Salzsäure bestimmt werden. Dabei wurde der Ammoniakgehalt aus der verbrauchten Menge an Salzsäure errechnet.

3.3.2.9 Mikrobiologie und Endotoxine

Die mikrobiologische Untersuchung des frischen Zäkuminhaltes erfolgte durch Biocheck, Leipzig, Germany. Die Proben wurden auf Gesamtkeimzahl aerober mesophiler und aerober gramnegativer Keime, Keimzahl Anaerobier, sporenbildende Anaerobier, Clostridium spp., Bacteroides spp., Enterococcus spp., Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp. und Hefen untersucht.

Die Untersuchung der Endotoxine erfolgte ebenfalls durch Biocheck, Leipzig, Germany mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test). In einer Modifikation der Vorschriften der Pharmakopöe (deutsches Arzneibuch) wurde das Gesamtendotoxin in der Probenflüssigkeit nach Hitzeinaktivierung (5 - 10 min. bei 75°C) bestimmt. Zum quantitativen Nachweis dient die durch Endotoxine gram-negativer Bakterien aktivierte Gerinnungskaskade im Lysin von Amöbozyten der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebes (Limulus polyphemus). Als Kontrollwert wird ein chemisch reines Standard-Lipopolysaccharid (BANG 1956) herangezogen.

3.3.2.10 Gasvolumen

Die produzierte Gasmenge wurde während der Caesitec-Inkubation mit einem speziell konstruierten Plastikmesszylinder (siehe Anhang Abb. 4) und einer Beutelpresse (Leipzig) durch Wasserverdrängung in einer Wanne ermittelt. Dabei konnte das Gasvolumen an der Zylinderskalierung in ml abgelesen werden. Vor dem Start des Systems und vor jeder Probennahme erfolgte eine Gasspülung (je 1 Liter Spezialgas), um sämtliches produziertes Gas aus dem System in den Gasbeutel zu spülen. Durch Messung des Überlaufes in die 1-Liter-Überlaufflasche, ergab sich ein zu berücksichtigender Gas-Zufluß in den Gasbeutel. Die Netto-Gas-Produktion (NGP) wird in ml angegeben und kann mit folgender Formel errechnet werden:

Material und Methoden

$$\text{NGP} = \text{gemessene Gasmenge} - (1000\text{ml} + x \text{ ml Überlauf})$$

Die Gasproduktion in den HGT-Kolben wurde direkt an der Kolbenskalierung in ml abgelesen.

3.3.2.10 Gaszusammensetzung

Die Gaszusammensetzung wurde am SHIMADZU GC8 Gaschromatographen ermittelt. Jeweils 1 ml Gasprobe wurde manuell injiziert und mittels 3 m langer Trennsäule (Molekularsieb 13X 60/80 mesh (Supelco) aufgetrennt. Zur quantitativen Erfassung von Methan und Wasserstoff diente ein Wärmeleitfähigkeitsdetektor (Fa. Shimadzu). Die Messung erfolgte unter folgenden Chromatographiebedingungen:

Injektortemperatur 80 °C, Säulenofentemperatur 40 °C (isotherm), Detektortemperatur 80 °C, Detektorstrom 80 mA, Trägergas Argon 40 ml / min (Einstellung: 180 kPa),

Integrator: Shimadzu CR-1B.

Statistische Auswertung

3.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mittels PASW Statistics 18. Mein Dank gilt an dieser Stelle den geduligen MitarbeiterInnen des IMISE Leipzig für deren statistische Anleitung.

Folgende statistische Methoden wurden verwendet:

- Berechnung der arithmetischen Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (S)
- Zweifaktorielle Varianzanalyse ANOVA der Caesitec-Daten
(feste Faktoren: Versuch, Tag)
- Zweifaktorielle Varianzanalyse ANOVA der Caesitec-Daten
(feste Faktoren: Versuch, Zeit 12 h + 24 h p.p.)
- Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA der Caesitec-Daten der Blindfermenter
(fester Faktor: Versuch)
- Zweifaktorielle Varianzanalyse ANOVA der HGT-Daten (Endparameter)
(feste Faktoren: Versuch, Substrat)
- Dreifaktorielle Varianzanalyse ANOVA der HGT-Daten (Gasproduktion)
(feste Faktoren: Versuch, Zeit nach Inkubationsbeginn, Substrat)
- Posthoc Analyse mittels Duncan
- Bestimmung vom Streuungsmaß s als Reststreuung aus der Varianzanalyse

Als signifikant galten p-Werte $<0,05$, als hochsignifikant $p<0,001$. Signifikanzen wurden in den Tabellen in Form von unterschiedlichen Kleinbuchstaben angegeben. Im Text wurden Mittelwert und Standardabweichung jeweils in Klammern (MW \pm SD) angegeben.

Ergebnisse

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Studie werden im folgenden Kapitel in Parameter des Inkubationsmediums und der Gaserfassung unterteilt aufgelistet. Hierbei werden die Caesitec-Versuche mit V1, V2, und V3, die Versuchstage mit T1 bis T9 und die Messungen 12 Stunden postprandial mit T 5,5 und 7,5 bezeichnet. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu schaffen, wurden in den Caesitec-Versuchen die Tage der Konzentratgabe (V1: Tag 5 + 8, V2: Tag 5 + 7, V3: Tag 5 + 7) übereinandergelegt. Dies wurde durch die Tatsache ermöglicht, dass mittels Vorversuch die Annäherung an die Ausgangsbedingungen 48 h nach der Provokationsfütterung belegt wurde (siehe Anhang Tab. A 00). Zudem wurden in Versuch 1 sowohl 48 Stunden als auch 72 Stunden nach der ersten Raftilosefütterung annähernd ähnliche pH-Werte (siehe Anhang Tab. A 00) gemessen.

Die HGT-Studien werden mit HGT I, HGT II und HGT III und die Messzeiten der HGT-Versuche mit t0 bis t3 benannt. Zur Auswertung in der HGT-Studie kommen nur Daten, die in identischen Zeitintervallen (0, 3, 6, 18 h) erhoben wurden.

Alle Einzeldaten, Mittelwerte der einzelnen Versuche und Mittelwerte der Studien sowie die Signifikanzen der Haupteffekte und deren Wechselwirkungen sind im Anhang aufgelistet.

Im Folgenden sind die wichtigsten statistischen Daten der Caesitec-Versuche (Tab. 11 Teil I, II) und der HGT-Studie (Tab. 12 Teil I, II, Tab. 13 Teil I, II, Tab. 14) tabellarisch dargestellt.

Ergebnisse

Tab. 11 (Teil D): Mittelwerte, Signifikanzen, Wechselwirkungen der Haupteffekte und Streuungsmaß S der 2-faktoriellen varianzanalytischen Auswertung (Faktoren: Versuch V, Tag T) der Caesitec-Studie (Fettsäuren, Ammoniak, Laktat in mmol/l, Gasvolumen in ml, Gase in $\mu\text{mol/l}$, Endotoxin in EU/ml)

Parameter	Produkt			$\pm S$ = $\sqrt{\text{MQR}}$	Versuch		
	V	T	V*T		1	2	3
Redox	0,000	0,000	0,000	10,1	-363 b	-357 a	-379 c
pH	0,000	0,000	0,000	0,063	6,55 a	6,60 b	6,78 c
Gasvol.	0,000	0,000	0,000	172,6	956 b	1213 c	676 a
H ₂	0,030	0,170	0,030	1100,575	47,76 a	893,07 b	214,81 ab
CH ₄	0,001	0,022	0,423	1769,148	1207,56 a	2639,90 b	670,50 a
H ₂ :CH ₄	0,341	0,346	0,562	2,457	0,075 a	1,195 a	1,376 a
FFS	0,015	0,000	0,000	10,4917	38,395 a	36,980 a	29,323 b
Acetat	0,916	0,000	0,152	6,4236	17,497 a	15,904 a	16,015 a
Propionat	0,009	0,000	0,000	3,9546	11,757 b	10,369 b	7,576 a
i-Butyrat	0,358	0,510	0,793	0,1342	0,167 a	0,125 a	0,102 a
n-Butyrat	0,000	0,000	0,000	1,3413	5,190 b	7,607 c	3,863 a
i-Valeriat	0,085	0,000	0,000	0,1140	0,228 a	0,269 a	0,206 a
n-Valeriat	0,000	0,000	0,000	0,3377	3,301 c	1,318 b	0,552 a
n-Capronat	0,000	0,000	0,000	0,5559	0,255 a	1,388 c	1,011 b
SIS	0,172	0,000	0,006	0,1673	0,395 a	0,394 a	0,308 a
A:P	0,000	0,002	0,000	0,6148	1,642 a	1,627 a	2,741 b
Laktat ges.	0,000	0,000	0,000	2,1095	0,046 a	0,902 a	9,086 b
L-Laktat	0,000	0,000	0,000	1,8138	0,028 a	0,667 a	6,670 b
D-Laktat	0,000	0,000	0,000	0,3768	0,018 a	0,235 a	2,416 b
NH ₃	0,000	0,000	0,000	0,989	18,47 b	18,14 b	15,45 a
Endotoxin	0,000	0,008	0,016	50,7480	k1	(133,245)	(15,146)

k1 keine Daten,

() kein posthoc-Test, da < 3 Gruppen

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Ergebnisse

Tab. 11 (Teil II): Mittelwerte, Signifikanzen, Wechselwirkungen der Haupteffekte und Streuungsmaß S der 2-faktoriellen varianzanalytischen Auswertung (Faktoren: Versuch V, Tag T) der Caesitec-Studie (Fettsäuren, Ammoniak, Laktat in mmol/l, Gasvolumen in ml, Gase in $\mu\text{mol/l}$, Endotoxin in EU/ml)

Parameter	Tag								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Redox	-371cd	-364 bc	-363 bc	-372 cd	-376 de	-339 a	-379 de	-355 b	-386 e
pH	6,72 cd	6,66 c	6,77 def	6,80 ef	6,82 f	6,37 b	6,83 f	6,22 a	6,58 de
Gasvol.	609 c	339 a	385 ab	382 ab	521 abc	2760 d	542 bc	2856 d	493 abc
H ₂	14,18 a	172,23 a	115,41 a	144,23 a	39,59 a	943,78 ab	1645,51 b	683,13 ab	355,37 a
CH ₄	183,99 a	621,60 ab	683,84 ab	1125,10 ab	3477,85 c	1260,07 ab	2115,23 abc	2282,65 abc	2612,90 bc
H ₂ :CH ₄	0,103 a	0,392 a	0,183 a	0,304 a	0,013 a	2,413 a	2,87 a	0,538 a	2,032 a
FFS	46,190 d	43,024 cd	31,841 abc	24,269 a	23,745 a	37,972 bcd	29,822 ab	44,276 d	25,899 a
Acetat	28,655 d	23,923 cd	17,362 bc	13,951 ab	14,153 ab	11,856 ab	13,596 ab	11,884 ab	9,789 a
Propionat	12,135 cd	14,165 d	11,234 bcd	7,646 abc	6,334 a	11,354 bcd	6,924 ab	10,823 bcd	4,621 a
i-Butyrat	0,211 a	0,184 a	0,144 a	0,118 a	0,080 a	0,081 a	0,101 a	0,113 a	0,095 a
n-Butyrat	4,119 c	3,714 bc	2,377 ab	1,950 a	2,384 ab	10,955 e	5,854 d	13,340 f	5,867 d
i-Valeriat	0,651 d	0,560 d	0,269 c	0,158 bc	0,130 ab	0,052 ab	0,136 ab	0,090 ab	0,016 a
n-Valeriat	0,415 a	0,470 a	0,428 a	0,421 a	0,589 a	3,097 c	1,617 b	4,564 d	1,752 b
n-Capronat	0,004 a	0,009 a	0,029 a	0,025 a	0,075 a	0,578 a	1,594 b	3,472 c	3,760 c
SIS	0,862 c	0,744 c	0,413 b	0,276 ab	0,210 a	0,133 a	0,237 ab	0,203 a	0,111 a
A:P	2,365 cde	1,730 abc	1,563 ab	1,870 abc	2,240 bcde	2,052 bcd	2,880 e	1,274 a	2,611 de
Laktat ges.	0,081 a	0,055 a	0,041 a	0,040 a	0,029 a	18,030 b	0,080 a	14,975 c	0,626 a
L-Laktat	0,052 a	0,033 a	0,027 a	0,030 a	0,019 a	14,108 b	0,067 a	10,158 c	0,434 a
D-Laktat	0,028 a	0,022 a	0,014 a	0,010 a	0,010 a	3,922 b	0,013 a	4,817 c	0,192 a
NH ₃	21,96 g	22,21 g	20,44 f	20,01 f	17,84 e	12,21 b	16,03 d	9,03 a	14,05 c
Endotoxin	k1	k1	k1	k1	13,076 a	108,531 bc	63,864 abc	127,502 c	58,005 ab

k1 keine Daten,

() kein posthoc-Test, da < 3 Gruppen

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Ergebnisse

Tab. 12 (Teil I): Mittelwerte, Signifikanzen, Wechselwirkungen der Haupteffekte und Streuungsmaß S der 2-faktoriellen varianzanalytischen Auswertung (Faktoren: Versuch V, Zeit 12, 24 Stunden ppr.) der Caesitec-Studie (Fettsäuren, Ammoniak, Laktat in mmol/l, Endotoxin in EU/ml)

Parameter	Produkt			± S = √MQR	Versuch		
	V	T	V*T		1	2	3
pH	0,000	0,000	0,000	0,063	6,67 c	5,77 a	6,08 b
FFS	0,000	0,000	0,000	4,7547	27,700 b	36,028 c	20,962 a
Acetat	0,920	0,074	0,852	3,4424	13,810 a	12,532 a	11,959 a
Propionat	0,000	0,010	0,000	1,4184	7,862 b	9,735 b	3,384 a
i-Butyrat	0,481	0,005	0,545	0,1049	0,138 a	0,144 a	0,116 a
n-Butyrat	0,000	0,000	0,000	1,9741	3,668 a	10,260 b	3,864 a
i-Valeriat	0,049	0,457	0,538	0,0894	0,199 b	0,140 ab	0,061 a
n-Valeriat	0,000	0,000	0,003	0,4572	1,857 b	1,669 b	0,547 a
n-Capronat	0,071	0,000	0,008	0,8050	0,166 a	1,549 b	1,031 ab
SIS	0,114	0,037	0,536	0,1673	0,337 a	0,283 a	0,177 a
A:P	0,000	0,226	0,000	0,8081	1,798 a	1,518 a	4,156 b
Gesamtlaktat	0,000	0,000	0,000	2,1394	0,114 a	18,106 b	25,848 c
L-Laktat	0,000	0,000	0,000	2,7035	0,084 a	14,271 b	21,007 c
D-Laktat	0,010	0,000	0,000	0,7078	0,031 a	3,835 b	4,841 c
NH ₃	0,891	0,000	0,000	1,4244	17,005 b	12,406 a	12,132 a
Endotoxin	0,01	0,07	0,10	46,565	(71,37)	(16,58)	k1

k1 keine Daten,

() kein posthoc-Test, da < 3 Gruppen

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Ergebnisse

Tab. 12 (Teil II): Mittelwerte, Signifikanzen, Wechselwirkungen der Haupteffekte und Streuungsmaß S der 2-faktoriellen varianzanalytischen Auswertung (Faktoren: Versuch V, Zeit 12, 24 Stunden ppr.) der Caesitec-Studie (Fettsäuren, Ammoniak, Laktat in mmol/l, Endotoxin in EU/ml)

Parameter	Tag			
	5	5,5	7	7,5
pH	6,82 c	5,06 b	6,83 c	4,88 a
FFS	23,745 a	21,494 a	29,822 b	39,531 c
Acetat	14,153 a	12,213 ab	13,596 a	8,978 b
Propionat	6,334 a	5,468 a	6,924 ab	8,335 b
i-Butyrat	0,080 a	0,287 b	0,101 a	0,084 a
n-Butyrat	2,384 a	2,788 a	5,854 b	16,923 c
i-Valeriat	0,130 a	0,130 a	0,136 a	0,049 a
n-Valeriat	0,589 a	0,437 a	1,617 b	2,291 c
n-Capronat	0,075 a	0,172 a	1,594 b	2,874 c
SIS	0,210 a	0,416 b	0,237 ab	0,132 a
A:P	2,240 a	2,353 a	2,880 a	1,975 a
Gesamtlaktat	0,029 a	54,493 c	0,080 a	33,346 b
L-Laktat	0,019 a	46,025 c	0,067 a	24,471 b
D-Laktat	0,010 a	8,468 b	0,013 a	8,875 b
NH ₃	17,844 d	10,749 b	16,034 c	4,492 a
Endotoxin	13,08 a	20,27 ab	63,86 ab	78,70 b

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Ergebnisse

Tab. 13 (Teil I): Mittelwerte, Signifikanzen, Wechselwirkungen der Haupteffekte (Versuch V, Substrat S) und Streuungsmaß S der 2-faktoriellen varianzanalytischen Auswertung der HGT-Studie

Parameter	Produkt			± S = $\sqrt{MQ_R}$	Versuch		
	V	S	V*S		HGT I	HGT II	HGT III
pH	0,000	0,000	0,000	0,032	6,91 a	6,90 a	7,22 b
H ₂ [μmol/l]	0,048	0,006	0,024	438,714	683,57 b	10,35 a	32,19 a
CH ₄ [μmol/l]	0,000	0,000	0,000	271,155	355,73 b	703,77 c	62,19 a
H ₂ :CH ₄	0,512	0,887	0,810	5,933	0,08 a	0,01 a	4,59 a
NGP [ml]	0,000	0,000	0,000	0,725	4,50 b	5,40 c	1,76 a
NGP[ml]/100mg	0,000	0,000	0,000	1,287	9,32 b	10,97 c	3,35 a
FFS [mmol/l]	0,000	0,000	0,002	4,584	24,50 b	28,88 c	19,56 a
FFS[mmol/l]/100mg	0,000	0,003	0,011	9,682	42,50 b	50,62 c	35,02 a
Acetat [mmol/l]	0,000	0,000	0,006	2,940	15,81 b	17,91 c	13,18 a
Propionat [mmol/l]	0,000	0,000	0,000	1,066	6,57 b	7,71 c	4,41 a
i-Butyrat [mmol/l]	0,000	0,044	0,619	0,100	0,15 a	0,23 b	0,16 a
n-Butyrat [mmol/l]	0,000	0,000	0,002	0,448	1,65 a	2,48 b	1,47 a
i-Valeriat [mmol/l]	0,000	0,000	0,053	0,077	0,22 b	0,34 c	0,17 a
n-Valeriat[mmol/l]	0,001	0,066	0,395	0,122	0,09 a	0,20 b	0,16 ab
n-Capronat [mmol/l]	0,461	0,561	0,367	0,071	0,01 a	0,02 a	0,04 a
SIS [mmol/l]	0,000	0,000	0,121	0,118	0,37 a	0,57 b	0,34 a
A:P	0,000	0,000	0,000	0,459	2,57 a	2,78 a	3,38 b
L-Laktat [mmol/l]	0,000	0,354	0,005	0,148	0,09 a	0,15 a	0,16 a
D-Laktat [mmol/l]	0,000	0,000	0,000	0,000	0,04 b	0,02 a	0,07 c
Gesamtlaktat[mmol/l]	0,000	0,236	0,000	0,152	0,13 a	0,17 a	0,23 a
NH ₃ [mmol/l]	0,000	0,000	0,000	0,956	13,94 b	18,15 c	12,92 a

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Ergebnisse

Tab. 13 (Teil II): Mittelwerte, Signifikanzen, Wechselwirkungen der Haupteffekte (Versuch V, Substrat S) und Streuungsmaß S der 2-faktoriellen varianzanalytischen Auswertung der HGT-Studie

Parameter	Substrat							
	BW fest	BW flüssig	BW H	BW R	fest H	fest H + R	flüssig H	flüssig H + R
pH	7,12 e	6,99 c	7,06 d	7,16 f	7,05 d	6,99 c	6,93 b	6,87 a
H ₂ [μmol/l]	9,05 a	5,18 a	58,07 a	3,34 a	372,07 ab	697,04 b	25,07 a	21,00 a
CH ₄ [μmol/l]	330,86 ab	151,31 ab	0,00 a	207,16 ab	203,01 ab	95,66 a	1112,41 c	516,53 b
H ₂ :CH ₄	0,47*	0,03*	k1*	0,02*	4,83*	1,80*	0,07*	0,17*
NGP [ml]	1,40 b	1,42 b	1,25 b	0,10 a	2,67 c	6,67 e	5,00 d	8,28 f
NGP[ml]/100mg	k1	k1	2,50 b	0,20 a	5,33 c	10,65 d	10,00 d	13,24 e
FFS [mmol/l]	18,96 b	33,45 c	2,73 a	1,91 a	17,41 b	22,00 b	42,90 d	41,75 d
FFS[mmol/l]/100mg	k1	k1	5,46 a	3,79 a	34,78 b	35,13 b	84,98 d	66,76 c
Acetat [mmol/l]	12,81 b	21,94 c	2,20 a	1,46 a	10,98 b	13,51 b	27,62 d	26,50 d
Propionat [mmol/l]	4,20 b	7,68 c	0,37 a	0,31 a	4,93 b	6,69 c	10,58 d	10,96 d
i-Butyrat [mmol/l]	0,12 ab	0,31 c	0,02 ab	0,02 a	0,11 ab	0,14 b	0,38 c	0,28 c
n-Butyrat [mmol/l]	1,47 b	2,87 c	0,10 a	0,07 a	1,16 b	1,35 b	3,57 d	3,35 cd
i-Valeriat [mmol/l]	0,18 b	0,43 c	0,02 a	0,02 a	0,15 b	0,17 b	0,41 c	0,45 c
n-Valeriat[mmol/l]	0,14 abc	0,22 bc	0,02 a	0,02 a	0,08 ab	0,19 bc	0,27 c	0,20 bc
n-Capronat [mmol/l]	0,04 a	0,01 a	0,01 a	0,01 a	0,00 a	0,03 a	0,07 a	0,01 a
SIS [mmol/l]	0,30 b	0,74 c	0,05 a	0,04 a	0,26 b	0,30 b	0,79 c	0,73 c
A:P	3,16 d	2,94 cd	6,30 e	2,83 bcd	2,34 ab	2,13 a	2,64 abcd	2,47 abc
L-Laktat [mmol/l]	0,09 a	0,08 a	0,69 b	0,02 a	0,05 a	0,07 a	0,07 a	0,09 a
D-Laktat [mmol/l]	0,04 b	0,04 b	0,09 c	0,01 a	0,04 b	0,05 b	0,04 b	0,03 b
Gesamtlaktat[mmol/l]	0,13 a	0,12 a	0,78 b	0,02 a	0,09 a	0,12 a	0,11 a	0,13 a
NH ₃ [mmol/l]	16,50 d	16,36 cd	13,47 a	13,05 a	14,79 b	14,79 b	15,33 bc	15,52 bcd

BW Blindwerte

Fest Zäkuminhalt Festphase

Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase

H Heu

R Raftilose

k1 keine Daten oder keine Substrateinwaage

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

* geringe n-Zahl, statistisch nicht auswertbar

Ergebnisse

Tab. 14: Mittelwerte, Signifikanzen, Wechselwirkungen der Haupteffekte (Versuch V, Substrat S, Zeit t) und Streuungsmaß S der 3-faktoriellen varianzanalytischen Auswertung der HGT-Studie

Parameter	Produkt							± S
	V	S	t	V*S	V*t	S*t	S*t*V	= √MQR
GB/100mg	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,9391
GB-I/100mg*h	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,2025

Parameter	Zeit				Versuch		
	t0	t1	t2	t3	HGT I	HGT II	HGT III
GB/100mg	0,000 a	1,225 b	2,993 c	7,848 d	3,746 b	3,798 b	1,236 a
GB-I/100mg*h	0,000 a	0,408 b	0,638 c	0,393 b	0,394 b	0,436 b	0,185 a

Parameter	Substrat							
	BW H	BW R	BW fest	fest H	fest H + R	BW flüssig	flüssig H	flüssig H + R
GB/100mg	0,956 b	0,049 a	0,000 a	2,056 c	4,038 d	0,000 a	4,171 d	5,254 e
GB-I/100mg*h	0,130 ab	0,004 a	0,000 a	0,240 b	0,457 c	0,000 a	0,479 c	0,642 d

GB/100mg Gasbildung (ml/100 mg Substrat)

GB_I/100mg*h Gasbildung Intervall pro Stunde (ml/100mg*h)

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte (p < 0,05) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

0,000 keine Substrateinwaage

Ergebnisse

4.1 Inokulumzusammensetzung

Nach der Analyse des Zäkuminhaltes der 3 Versuchspferde mittels Weender- Verfahren und anschließender Mineralstoffanalyse wurden folgende Nährwerte (Tab. 15) bestimmt. Im Anhang (Tab. 4) befindet sich eine Auflistung der Nährstoffe in Orginal-, Lufttrocken- sowie Trockensubstanz.

Tab. 15: Rohnährstoff- und Mineralstoffgehalt des Zäkuminhaltes der Versuche (V1, V2, V3)

Rohnährstoffe		in oS (%)		
		V1	V2	V3
Trockensubstanz	TS	8,05	6,10	4,00
Rohasche	Ra	1,02	0,96	0,90
Rohprotein	Rp	0,78	0,62	0,32
Rohfaser	Rfa	2,60	1,84	1,14
Rohfett	Rfe	0,16	0,14	0,06
NfE		3,50	2,54	1,59
organische Substanz		7,03	5,14	3,10
Stickstoffgehalt	N	0,12	0,10	0,05
NDF		4,97	3,65	2,17
ADF		2,92	2,08	1,31
Zellulose		2,38	1,77	1,05
Lignin		0,54	0,31	0,25
Mineralstoffe		in oS (%)		
Calcium	Ca	0,01	0,01	0,01
Magnesium	Mg	0,01	0,01	0,00
Phosphor	P	0,04	0,04	0,03
Kalium	K	0,12	0,12	0,06
Natrium	Na	0,27	0,27	0,32
		(mg/kg)		
Zink	Zn	4,05	2,92	1,43
Kupfer	Cu	0,91	1,05	0,42

Ergebnisse

4.2 Parameter in Inkubationsflüssigkeit

In den folgenden Betrachtungen werden die Caesitec- und HGT-Ergebnisse stets gemeinsam unter dem gemessenen Parameter abgehandelt.

4.2.1 Titrationsazidität

Der Ausgangs-pH-Wert unterschied sich zwischen den Versuchen sowohl im Kot-Wasser- als auch Zäkuminhalt-Wasser-Gemisch (siehe Tab. 16). Die Titrationsazidität zwischen dem Ausgangs-pH-Wert und pH 6 lag im Mittelwert im Kot-Wasser-Gemisch bei 0,0048 mmol/l und im Zäkum-Wasser-Gemisch bei 0,0654 mmol/l. Zwischen pH 6 und pH 5 war im Kot-Wasser-Gemisch eine Titrationsazidität von 0,0347 mmol/l im Mittelwert und im Zäkum-Wasser-Gemisch von 0,1265 mmol/l messbar.

Tab. 16: Ausgangs-pH-Wert und Titrationsaziditäten (mmol/l) des Kot-Wasser- (Kot) und Zäkuminhalt-Wasser-Gemisches (Zäkuminhalt) der Spenderpferde der Caesitec- und HGT-Studien (V1, V2, V3) sowie deren Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (S)

Medium	Parameter	V1	V2	V3	MW	± S
Kot	Start-pH	6,16	6,16	6,39	6,24	0,130
	TA 1 [mmol/l]	0,005	0,003	0,006	0,005	0,0019
	TA 2 [mmol/l]	0,056	0,025	0,023	0,035	0,0186
Zäkuminhalt	Start-pH	6,48	6,48	7,04	6,67	0,325
	TA 1 [mmol/l]	0,091	0,024	0,081	0,065	0,0364
	TA 2 [mmol/l]	0,223	0,074	0,082	0,126	0,0840

TA 1 Titrationsazidität zwischen Ausgangs-pH-Wert und pH 6

TA 2 Titrationsazidität zwischen pH 6 und pH 5

4.2.2 Redoxpotential

Bei der Caesitec-Methode bestand die Möglichkeit der Messung des Redoxpotentials vor der Probenahme. Zu jedem Zeitpunkt lag das Potential im deutlichen Minusbereich (siehe Anhang Tab. 7). Der höchste gemessene Wert betrug - 268 mV. Im Mittel war ein Redoxpotential von - 339 bis - 386 mV in den Probenfermentern und - 340 bis - 371 mV in den Blindfermentern zu messen. In der varianzanalytischen Auswertung wurden signifikante Einflüsse beider Haupteffekt beobachtet (siehe Tab. 11).

Während der HGT-Studie wurde kein Redoxpotential gemessen.

Ergebnisse

4.2.3 pH-Wert

Während der Caesitec-Studie schwankte der pH-Wert zwischen 4,72 und 7,21 (siehe Anhang Tab. 8). Nach Auswertung der varianzanalytischen Berechnung wurde ein signifikanter Einfluss von Versuch und Tag auf die Messwerte sowie Wechselwirkungen zwischen Tag und Versuch (siehe Anhang Tab. 51) beobachtet. In mit Raftilose inkubierten Fermentern lag ein hochsignifikant niedriger pH-Wert ($p < 0,001$) vor als in Fermentern ohne Konzentratfütterung (siehe Abb. 6).

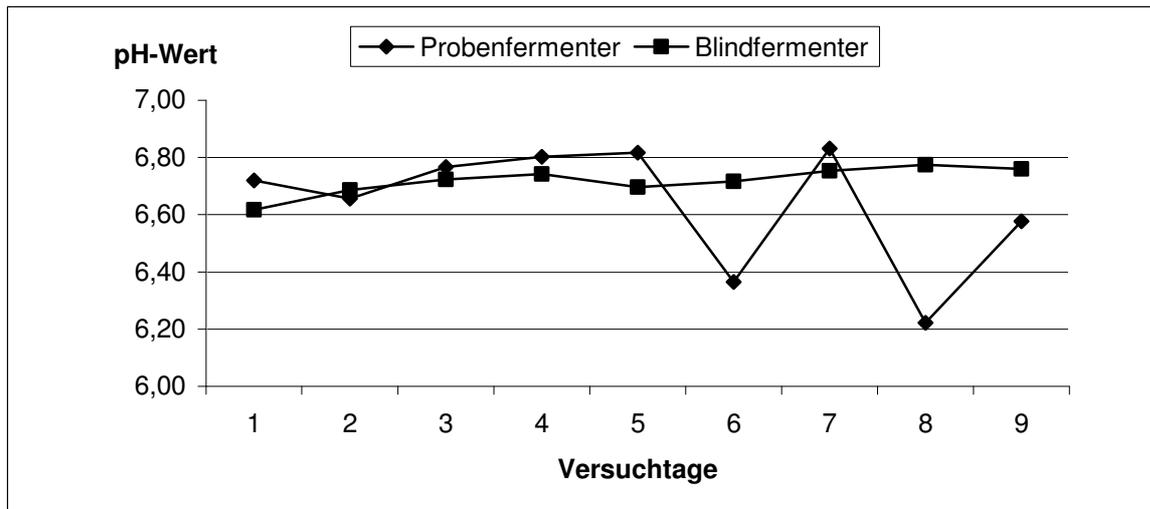


Abb. 6: Mittelwerte der pH-Wertmessung in der Inkubationsflüssigkeit der Probenfermenter und Blindfermenter der Caesitec-Studie

In der Mittelwertbetrachtung sank der pH-Wert nach Zugabe von Raftilose innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden hochsignifikant ($p < 0,001$) ab (MW 5,06; 6,37). Erst 48 Stunden nach der ersten Provokationsfütterung hatte der pH-Wert annähernd das Ausgangsniveau der Einstellphase (Tag 3-5) erreicht (siehe Anhang Tab. 8). Nach der zweiten Konzentratgabe fiel der Wert noch stärker (MW 4,885) und erneut hochsignifikant ab. Diese beiden pH-Wert-Reduktionen unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Der pH-Wert stieg nach der 2. Provokationsfütterung nur langsam an und erreichte auch 48 Stunden nach dieser Provokationsfütterung den Ausgangswert nicht wieder (MW 6,5). Der pH-Wert in Versuch 3 der Caesitec-Studie unterschied sich signifikant vom pH-Wert in V1 und V2 ($p < 0,001$) (siehe Abb. 7).

Ergebnisse

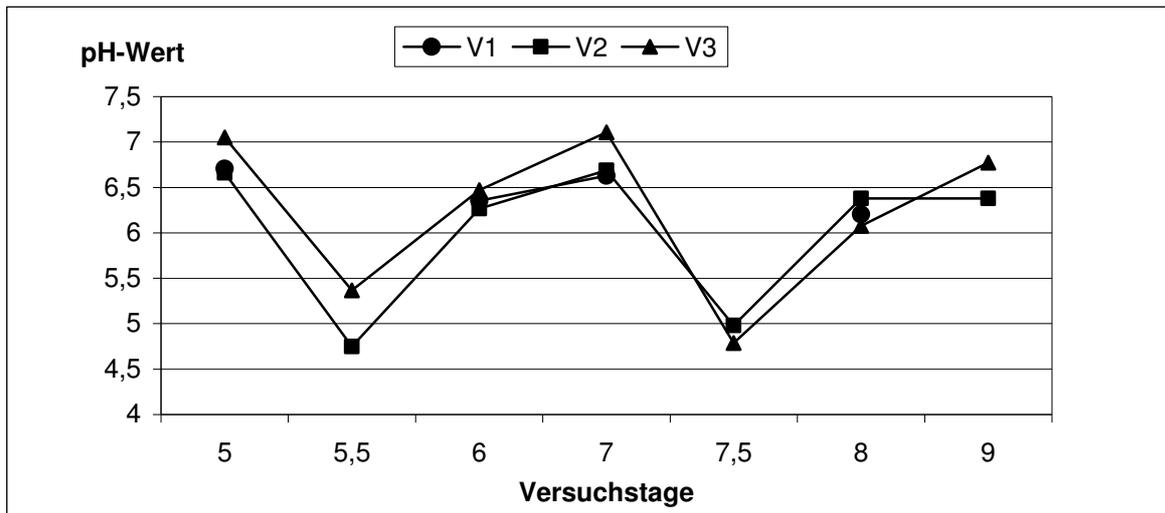


Abb. 7: Mittelwerte der pH-Wert-Messung der einzelnen Caesitec-Versuche (V1, V2, V3) von Tag 5 bis Tag 9

In der HGT-Studie zeigten beide Haupteffekte in der Varianzanalyse (Faktoren: Substrat, Versuch) einen signifikanten Einfluss auf den pH-Wert. Es bestanden Wechselwirkungen, welche im Anhang in Tab. 52 dargestellt sind. Bei der Inkubation von flüssigem Zäkuminhalt wurden im Vergleich zu den Ansätzen mit festem Zäkuminhalt in beiden Substratvarianten hochsignifikant niedrigere pH-Werte gemessen (siehe Abb. 8). Bei Inkubation der Substratkombination (Heu + Raftilose) wurden sowohl nach Inkubation mit Zäkumflüssigphase als auch mit Festphase des Zäkuminhaltes hochsignifikant niedrigere pH-Werte gemessen als bei Heu allein. Der Einzelvergleich der HGT-Versuche ergab signifikante Unterschiede untereinander (siehe Tab. 13).

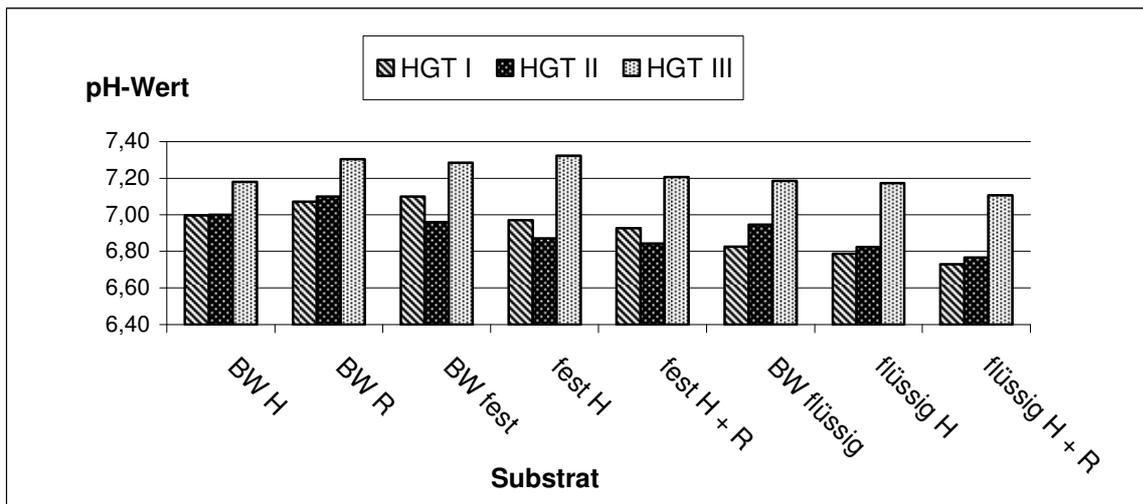


Abb. 8: Mittelwerte der pH-Wert-Erfassung in der Kolbenflüssigkeit der einzelnen HGT-Versuche (HGT I, HGT II, HGT III)

BW.....Blindwerte
H.....Heu

Flüssig.....Zäkumflüssigphase
R.....Raftilose

Fest.....Zäkumfestphase

Ergebnisse

4.2.4 kurzkettige Fettsäuren (FFS)

In der statistischer Auswertung der Konzentration der *Gesamtfettsäuren* der Blindfermenter der Caesitec-Studie ergaben sich sowohl zwischen den Versuchen als auch zwischen den Versuchstagen keine signifikanten Unterschiede. Auch bei den Messungen der einzelnen Fettsäuren (Azetat, Propionat, i-Butyrat, n-Butyrat, i-Valeriat, n-Valeriat, n-Capronat) sowie des Azetat-Propionat-Quotienten (A:P) und der Summe der Iso-Fettsäuren (SIS) traten in den Blindfermentern nach der Einstellphase keine signifikanten Schwankungen in der Konzentration auf.

Die Haupteffekte Versuch und Versuchstag hatten einen Einfluss auf die Gesamtfettsäurenkonzentration in den Probenfermentern. Bestehende Wechselwirkungen sind dem Anhang Tab. 51 zu entnehmen. Nach beiden Provokationsfütterungen wurde eine signifikant höhere Gesamtfettsäurenkonzentration gemessen als an den Tagen 4 und 5. Im Mittelwertvergleich aller Versuche (siehe auch V1, V2 in Anhang Tab. 16) sank die Gesamtfettsäurenkonzentration 12 Stunden nach der ersten Konzentratgabe (MW $21,49 \pm 3,97$ mmol/l) numerisch ab und stieg 24 Stunden ppr. signifikant an (MW $39,87 \pm 15,64$ mmol/l), um 48 Stunden ppr. auf einen über dem Ausgangswert liegenden Wert (MW $29,82 \pm 6,34$ mmol/l) abzufallen. Nach der zweiten Provokationsfütterung stieg die Konzentration der Fettsäuren im Mittelwert aller Versuche 12 Stunden ppr. ($39,53 \pm 23,52$ mmol/l) signifikant ($p < 0,05$) an. Dieser Konzentrationsanstieg unterschied sich hochsignifikant von der ersten Konzentratgabe (siehe Abb. 9). Das Maximum der Gesamtfettsäurenkonzentration wurde an Tag 8 (MW $44,28 \pm 23,67$ mmol/l) gemessen. An Tag 9 sank die Konzentration auf den Wert vor den Provokationsfütterungen (MW $25,90 \pm 2,81$ mmol/l) ab.

Im Vergleich der Messungen der Gesamtfettsäurenkonzentration der Einzelversuche fiel ein signifikanter Unterschied von Versuch 3 zu Versuch 1 und 2 auf (siehe Tab.11).

Ergebnisse

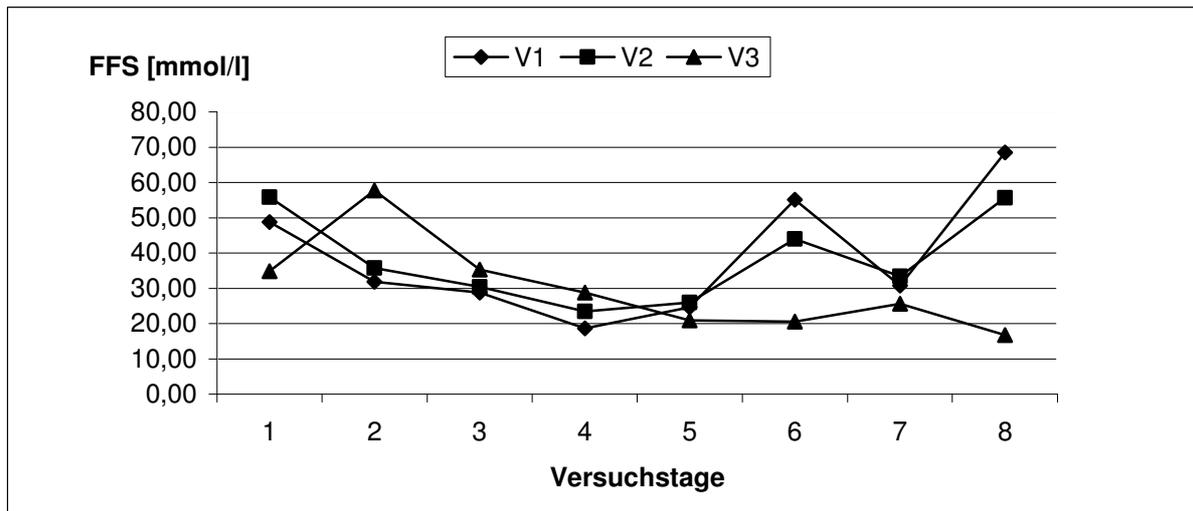


Abb. 9: Mittelwerte der Fettsäurekonzentration (mmol/l)) in der Inkubationsflüssigkeit der Caesitec-Probenfermenter der einzelnen Versuche (V1, V2, V3)

Auf die Konzentration von *Azetat* hatten die beiden Gaben von Raftilose in allen Caesitec-Versuchen keinen signifikanten Einfluss (siehe Anhang Tab. 17). Nach beiden Konzentratgaben war eine numerische Reduktion der *Azetat*konzentration zu beobachten.

Bei der statistischen Auswertung von *Propionat* hatten die Substitutionen von Raftilose im Mittelwertvergleich 24 Stunden nach der ersten Provokationsfütterung einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der Fettsäure (siehe Tab. 11) in der Fermenterflüssigkeit. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der *Propionat*konzentrationen 12 Stunden nach der ersten und der zweiten Raftilosegabe zur Ausgangskonzentration an Tag 5. Nach beiden Raftilosegaben stieg die *Propionat*konzentration im Mittelwertvergleich 24 Stunden ppr. an und fiel bis 48 Stunden ppr. ab. Versuch 3 unterschied sich signifikant von den anderen beiden Versuchen (siehe Anhang Abb. 3).

Der *Azetat-Propionat-Quotient* (*A:P*) in der Fermenterflüssigkeit schwankte im Mittelwertvergleich innerhalb der Einstellphase und sank 24 Stunden nach der ersten Raftilosegabe ab (siehe Anhang Tab. 24). Nach 48 Stunden stieg der Wert signifikant an und fiel nach der zweiten Fütterung (24 h ppr.) erneut hochsignifikant ($p < 0,001$) ab. Bis Tag 9 war der Quotient erneut signifikant ($p < 0,05$) angestiegen.

In der Einzelbetrachtung der Versuche waren die unterschiedlichen Reaktionen von V1 und V2 zu V3 auffällig (siehe Anhang Abb. 4). In Versuch 3 konnte aufgrund einer *Propionat*konzentration unter 0 an den Tagen 2, 7,5 und 8 teilweise kein *Azetat-Propionat*-

Ergebnisse

Quotient angegeben werden (mathematischer Fehler: Division durch 0).

Ein signifikanter Unterschied in der Konzentration von *i-Butyrat* wurde 12 Stunden nach der ersten Raftilosegabe im Vergleich zu den Konzentrationen an Tag 5, Tag 7 und Tag 7,5 (siehe Anhang Tab. 19) errechnet. Es handelte sich um die höchsten *i-Butyrat*-Konzentration ($0,287 \pm 0,1110$ mmol/l), die während der Studie beobachtet wurde. Auf weitere Messungen hatten die Haupteffekte (Versuch, Tag) im Mittelwertvergleich keinen signifikanten Einfluss.

Sowohl die Gabe von Raftilose als auch der Versuchsdurchlauf hatten auf die Konzentration von *i-Valeriat* keinen signifikanten Einfluss (siehe Anhang Tab. 21). Die Fütterung von Raftilose bewirkte im Mittelwertvergleich 24 Stunden nach der ersten Provokation einen Konzentrationsabfall. Nach 48 Stunden war der Wert wieder angestiegen. Bei der zweiten Gabe sank die Konzentration im Mittelwertvergleich nach 12 Stunden und stieg nach 24 Stunden leicht an. Die Versuche 1 und 2 folgten dieser Dynamik.

Auf die Summe der *Iso-Fettsäuren (SIS)* hatten die Haupteffekte nach der Einstellphase keinen signifikanten Einfluss. Lediglich die beiden Werte 12 Stunden ppr. unterschieden sich signifikant voneinander (siehe Tab. 12). Im Mittelwertvergleich sowie in der Einzelversuchanalyse von V2 und V3 stieg der Wert 12 Stunden nach der ersten Fütterung an (siehe Anhang Abb. 8). In allen Betrachtungen fiel die Summe der *Iso-Fettsäuren* nach 24 Stunden unter den Ausgangswert und erreichte diesen 48 Stunden ppr. wieder (siehe Anhang Abb. 5). Nach der zweiten Provokationsfütterung sank der Wert im Mittelwertvergleich, stieg nach 24 Stunden, um nach 48 Stunden erneut abzufallen.

Beide Haupteffekte hatten auf die *n-Butyrat*-Konzentration einen signifikanten Einfluss. Im Mittelwertvergleich stieg die Konzentration innerhalb von 12 Stunden nach der ersten Gabe numerisch und nach der zweiten Provokationsfütterung signifikant ($p < 0,001$) an. 24 und 48 Stunden ppr. waren nach beiden Raftilosegaben signifikant (T6, T7, T8: $p < 0,001$, T9: $p < 0,05$) höhere Konzentrationen messbar als in der Einstellphase (siehe Anhang Tab. 20).

In der Einzelauswertung der Versuchsdaten unterschied sich V 3 signifikant von den beiden anderen Versuchen. Versuch 1 und 2 zeigten eine ähnliche Konzentrationsdynamik der *n-Butyrat*-Konzentration wie der Mittelwertvergleich (siehe Anhang Abb. 6).

Ergebnisse

Die statistische Analyse der Konzentration von *n-Valeriat* ergab einen signifikanten Einfluss der Substratgabe. Im Mittelwertvergleich war 24 Stunden nach der ersten Raftilosegabe ein hochsignifikanter und 12 Stunden nach der zweiten Gabe ein signifikanter Anstieg (siehe Anhang Tab. 22) nachweisbar. Nach beiden Provokationen wurde die Maximalkonzentration 24 Stunden ppr. gemessen. Jeweils nach 48 Stunden fiel der Wert wieder ab. Die Tage 6, 7, 8 und 9 unterschieden sich hochsignifikant von der Einstellphase. Im Vergleich der beiden Raftilosegaben wurden bei der zweiten Provokationsfütterung ein rasanterer und höherer Konzentrationsanstieg und ein schnellerer Abfall zur Ausgangskonzentration gemessen. Alle 3 Durchläufe verhielten sich hochsignifikant verschieden voneinander.

Auf die Konzentration von *n-Capronat* hatte die Raftilosegabe einen signifikanten Einfluss. Im Mittelwertvergleich stieg der Wert 12 Stunden nach der ersten Provokationsfütterung an. Nach 48 Stunden war ein signifikanter Anstieg messbar. Der Wert stieg auch 12 Stunden nach der zweiten Fütterung signifikant weiter (siehe Anhang Tab. 23) und erreichte an Tag 9 seinen Höhepunkt. In der Einzelanalyse unterschieden sich alle Versuche signifikant voneinander.

In der HGT-Studie hatte die Qualität des Substrates (Heu oder Heu + Raftilose) innerhalb der beiden Inokula (Flüssig-, Festphase) keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der *Gesamtfettsäuren* (siehe Tab. 13). Jedoch unterschieden sich die Messungen der Konzentrationen zwischen beiden Inokula signifikant voneinander (siehe Abb. 10). Die Blindwerte von Heu, Raftilose und der Zäkumflüssigphase unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$) von den Messwerten mit Substrateinwaage. Die Konzentration in der Kolbenflüssigkeit des Blindwertes der Zäkumfestphase unterschied sich zu den Messungen mit Substrateinwaage (Heu, Heu + Raftilose) nicht. Es ergaben sich signifikante Effekte zwischen den Versuchen.

Ergebnisse

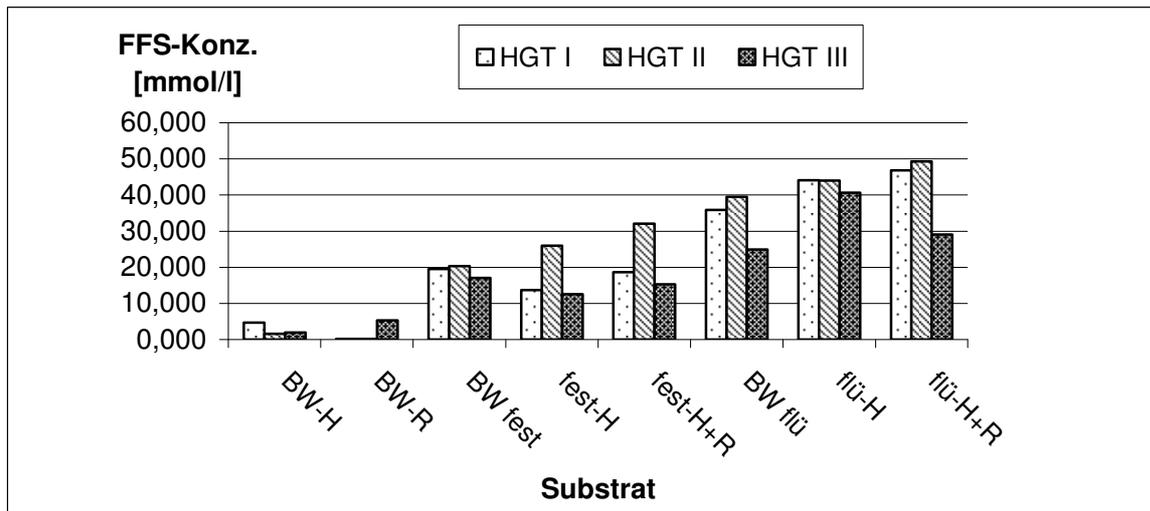


Abb. 10: Konzentration der Gesamtfettsäuren (mmol/l) in der Kolbenflüssigkeit der einzelnen HGT-Versuche (HGT I, HGT II, HGT III)

BW.....Blindwerte
H.....Heu

Flüssig.....Zäkumflüssigphase
R.....Raftilose

Fest.....Zäkumfestphase

Die statistische Auswertung der Berechnung der *Gesamtfettsäurenkonzentration pro 100 mg Substrat* ergab die gleichen Ergebnisse wie bei der Gesamtfettsäurekonzentration (siehe Tab. 13), mit dem Unterschied, dass die Substratqualität bei der Inkubation mit Zäkumflüssigphase einen signifikanten Einfluss ($p < 0,05$) hatte.

Bei der Betrachtung der einzelnen Fettsäuren wurde kein signifikanter Einfluss der Substratqualität (Heu oder Heu+ Raftilose) innerhalb eines Inokulums nachgewiesen, außer bei *Propionat* ($p < 0,05$) in dem Ansatz mit Zäkumfestphase. Einen signifikanten Effekt der Substratbeigabe, also einen Unterschied zwischen Inokulumbblindwert und Substrateinsatz gab es in den Ansätzen mit Zäkumfestphase bei *Propionat* (Heu+ Raftilose, $p < 0,05$), und der Inkubation mit Zäkumflüssigphase bei *Propionat* (beide Substrate, $p < 0,001$) und *Azetat* (Heu, $p < 0,05$). Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Einfluss der Inokula (Zäkumfest-, Zäkumflüssigphase) auf die Konzentrationen von *Azetat* ($p < 0,001$) und *i-Butyrat* ($p < 0,05$). Die Konzentrationsmessungen der Substratblindwerte von *Azetat*, *Propionat* und *n-Butyrat* unterschieden sich hochsignifikant von denen der anderen Ansätze. Bei *i-Butyrat* unterschieden sich die Konzentrationen der Substratblindwerte nur von denen des Ansatzes mit Zäkumflüssigphase. Die einzelnen Durchläufe unterschieden sich bei allen Fettsäuren, außer bei *i-Valeriat* und *n-Capronat* signifikant voneinander (siehe Tab. 16).

Bei der Mittelwertbetrachtung der statischen Auswertung des *Azetat-Propionat- Quotienten* wurde festgestellt, dass die Qualität des Substrates innerhalb eines Inokulums keinen

Ergebnisse

signifikanten Einfluss (siehe Tab. 13) hatte. Bei der Inkubation der Zäkumfestphase unterscheidet sich der Blindwert signifikant ($p < 0,05$) zur Inkubation mit Substrat und Substratkombination. Die Quotienten von HGT III waren signifikant verschieden zu denen der anderen HGT's.

4.2.5 L- und D-Laktat

Die Laktatkonzentration schwankte in der Einstellperiode der Caesitec-Studie in allen Fermentern um den Nullwert ($0,031 \pm 0,028$ mmol/l). Dies blieb in den Blindfermentern über die gesamte Versuchsdauer ($p > 0,05$) erhalten. Alle Haupteffekte (Versuch, Tag, Zeit) hatten signifikante Einflüsse auf die Konzentration an Gesamt-, D- und L-Laktat.

Nach jeder Konzentratgabe stiegen die Konzentrationen von Gesamt-, D- und L-Laktat im Mittelwertvergleich in den Probenfermentern hochsignifikant (12 Stunden ppr.) an. Hierbei wies L-Laktat den stärksten Anstieg (siehe Abb. 11) auf. Von diesem Höchstwert von $46,025 \pm 4,112$ mmol/l (L-Laktat) und $8,468 \pm 5,684$ mmol/l (D-Laktat) sank der Wert über 24 Stunden (L-Laktat: $14,107 \pm 14,987$ mmol/l, $p < 0,001$; D-Laktat: $10,157 \pm 14,636$ mmol/l, $p < 0,001$) bis 48 Stunden postprandial auf den Ausgangswert ab. Der Konzentrationsanstieg nach der zweiten Konzentratgabe fiel sowohl bei L-Laktat als auch bei D-Laktat weniger stark jedoch hochsignifikant zum Ausgangswert aus (siehe Anhang Tab. 10 und 11). Dabei unterschieden sich die Werte 12 Stunden nach den beiden Fütterungen bei Gesamtlaktat (siehe Anhang Tab. 9) und D-Laktat hochsignifikant voneinander. Die Messungen 24 Stunden ppr unterschieden sich jeweils bei D-, L- und Gesamtlaktat hochsignifikant voneinander.

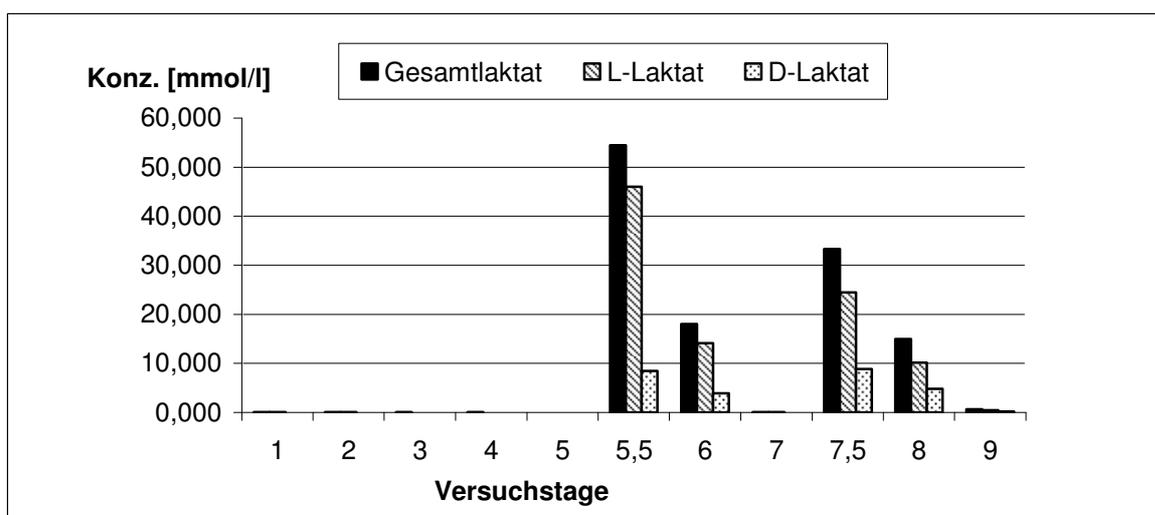


Abb. 11: Mittelwerte der Gesamt-, L- und D- Laktatkonzentration (mmol/l) in der Inkubationsflüssigkeit der Caesitec- Probenfermenter aller Versuche

Ergebnisse

Trotz der ähnlichen Dynamik auf die Raftilosegabe unterschieden sich die Versuche 1 und 2 hochsignifikant von Versuch 3. In der Betrachtung der Werte 12 Stunden ppr. unterschieden sich alle Versuche signifikant voneinander (siehe Wechselwirkungen Anhang Tab. 51).

Im Mittelwertvergleich der Konzentrationen von Gesamtlaktat, D- und L-Laktat der HGT-Methode hatten weder das Substrat innerhalb eines Inokulums noch die Inokulumvariante selbst einen signifikanten Einfluss. Nur in der varianzanalytischen Mittelwertbetrachtung von D-Laktat unterschieden sich die Durchläufe signifikant untereinander. Nur die Konzentrationen der Substratblindwerte unterschieden sich signifikant von den anderen Messungen. Wechselwirkungen zwischen den Haupteffekten wurden bei Gesamt- und D-Laktat nachgewiesen (siehe Anhang Tab. 52).

Bei der Inkubation von flüssigem Zäkuminhalt wurden jeweils numerisch höhere Gesamtlaktat- ($p > 0,05$) und L-Laktatkonzentrationen ($p > 0,05$) und geringere D-Laktatkonzentrationen ($p > 0,05$) gemessen als im Ansatz mit festem Zäkuminhalt (siehe Abb. 12).

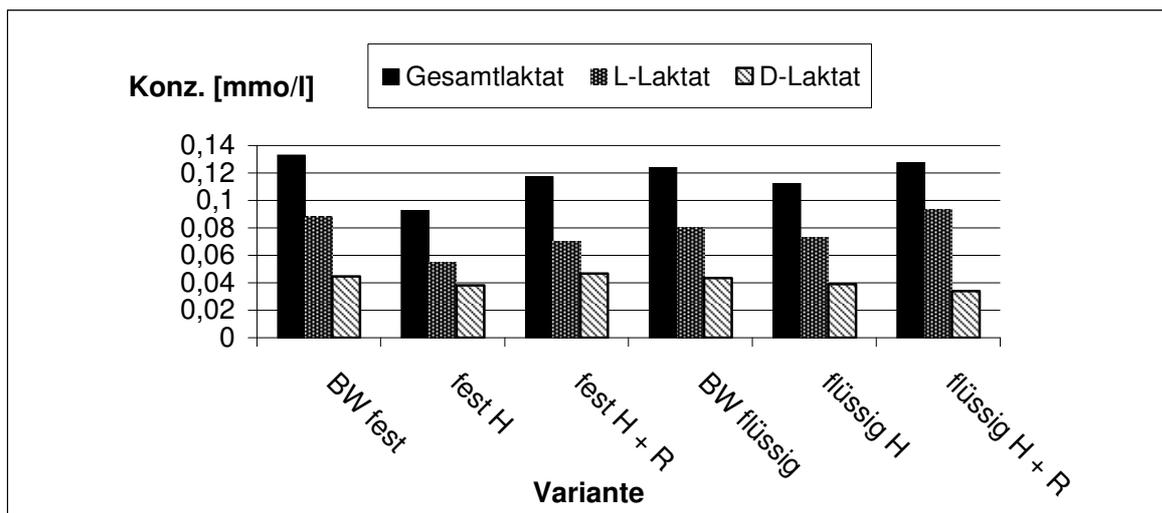


Abb. 12: Mittelwerte der Gesamt-, L- und D-Laktatkonzentration (mmol/l) in der Kolbenflüssigkeit aller HGT-Versuche

BW.....Blindwerte
H.....Heu

Flüssig.....Zäkumflüssigphase
R.....Raftilose

Fest.....Zäkumfestphase

Im Mittelwertvergleich zwischen den Substraten wurden bei der Inkubation von festem Zäkuminhalt mit der Substratkombination (Heu+ Raftilose) höhere Gesamt-, D- und L-Laktatkonzentrationen ($p > 0,05$) gemessen als bei der Variante mit Heu allein. Auch im Ansatz mit flüssigem Zäkuminhalt wurden bei der Inkubation von Heu und Raftilose numerisch höhere Gesamt- und L-Laktatkonzentrationen nachgewiesen als bei Heu allein. Die D-Laktatkonzentration war hier gegenüber der Variante mit Heu geringer.

Ergebnisse

4.2.6 Ammoniak

In der Caesitec-Studie hatten in beiden Varianzanalysen (Versuch + Tag; Versuch + Zeit) beide Haupteffekte signifikante Einflüsse auf die Ammoniakkonzentration.

In den ersten 5 Versuchstagen kam es in allen Fermentern zu einem kontinuierlichen Abfall der Ammoniakkonzentration. Im weiteren Verlauf schwankt der Ammoniakwert ($p > 0,05$) in den Blindfermentern um $15,78 \pm 1,52$ mmol/l (siehe Abb. 13). An Tag 5 war die Konzentration in den Probenfermentern signifikant niedriger als in der Einstellphase. Alle weiteren Konzentrationsmessungen unterschieden sich signifikant von einander. Im Mittelwertvergleich kam es in den Fermentern nach der Konzentratgabe innerhalb von 12 Stunden zu einem hochsignifikanten Abfall der Ammoniakkonzentration. Dieser war nach der zweiten Konzentratgabe ($p > 0,001$) ausgeprägter als bei der ersten. Hier war der Ammoniakwert trotz Anstieg nach 24 Stunden immer noch niedriger als 12 und 24 Stunden nach der ersten Konzentratgabe. Nach beiden Raftilosegaben stieg der Wert 24 Stunden postprandial wieder an ($p > 0,001$) und erreichte nach 48 Stunden ($p > 0,001$) annähernd seinen Ausgangswert (siehe Anhang Tab. 26).

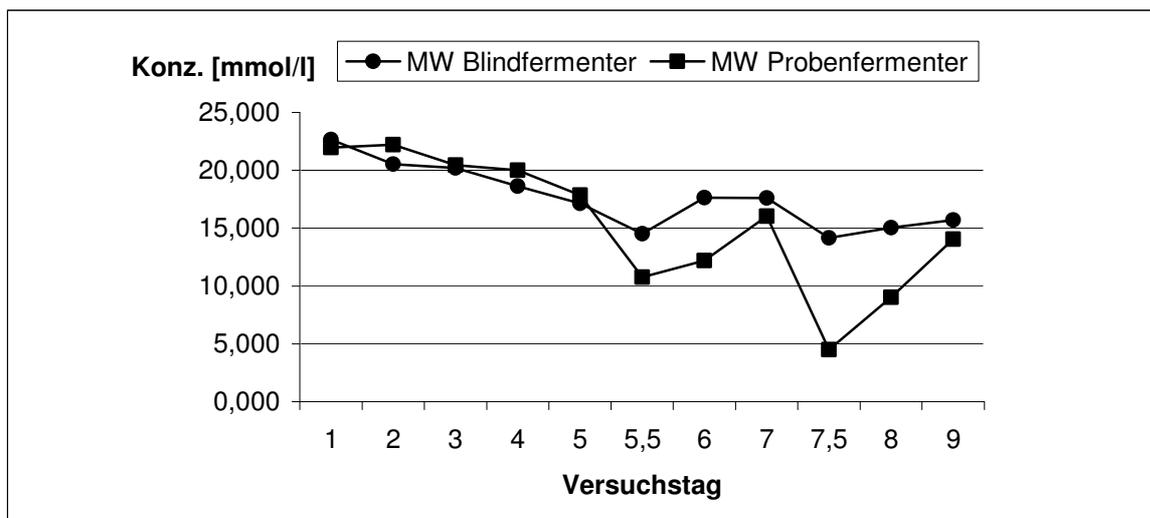


Abb. 13: Mittelwerte der Ammoniakkonzentration (mmol/l) in der Inkubationsflüssigkeit der Blindfermenter und Probenfermenter aller Caesitec-Versuche

Die Analyse der Einzelversuche ergab signifikante Unterschiede zwischen Versuch 3 zu Versuch 1 und 2, obwohl die Dynamik der Ammoniakkonzentrationen der einzelnen Versuche der des Mittelwertvergleiches folgten und nur die Stärke der Reaktion unterschiedlich ausfiel.

Im Mittelwertvergleich aller HGT-Versuche hatte der Versuch einen signifikanten Effekt auf

Ergebnisse

die Ammoniakkonzentration in der Kolbenflüssigkeit. Die Messungen der Inkubationen mit Substrat unterschieden sich weder zwischen den Inokula noch innerhalb eines Inokulums. Nur die Konzentration des Blindwertes der Zäkumfestphase unterschied sich signifikant von der Messung in den Ansätzen mit Substrat ($p < 0,05$). Gegenüber den Substratblindwerten wurden bei der Inkubation von Substrat mit Inokulum im Mittelwertvergleich hochsignifikant höhere Konzentrationen an Ammoniak nachgewiesen (siehe Tab. 13).

Es wurden bei der Variante mit flüssigem Zäkuminhalt numerisch höhere Konzentrationen an Ammoniak gemessen als bei festem Zäkuminhalt (siehe Tab. 13). Beide Inokulumblindwerte produzierten höhere Konzentrationen der Stickstoffverbindung als die anderen Varianten (siehe Abb. 14). In festem Zäkuminhalt waren in der Variante mit Heu als alleiniges Substrat höhere Ammoniakkonzentrationen nachweisbar als in der Kombination der beiden Futtermittel. In der flüssigen Inokulumvariante erreichte Heu mit Raftilose höhere Werte. Die Versuchsdurchläufe unterschieden sich signifikant voneinander.

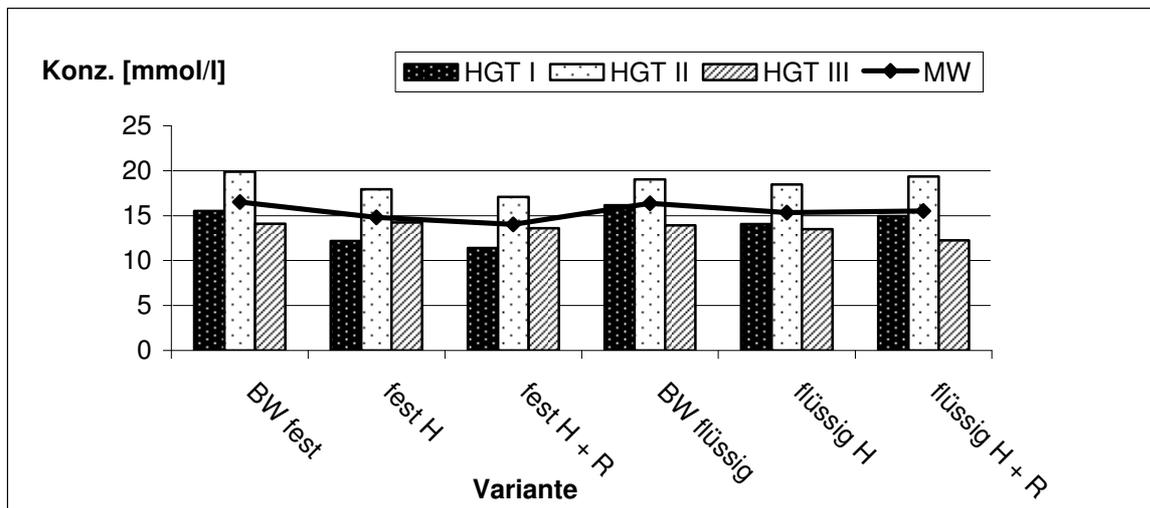


Abb. 14: Mittelwerte der Ammoniakkonzentration (mmol/l) in der Kolbenflüssigkeit der einzelnen HGT-Versuche (HGT I, HGT II, HGT III) und Mittelwert aller HGT-Versuche

BW.....Blindwerte
H.....Heu

Flüssig.....Zäkumflüssigphase
R.....Raftilose

Fest.....Zäkumfestphase

4.2.7 Mikrobiologie und Endotoxine

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung des Zäkuminhaltes, welcher direkt nach der Schlachtung den Spenderpferden entnommen wurde, befinden sich in der folgenden Auflistung (Tab. 17).

Ergebnisse

Tab. 17: Keimzahl (KbE/g) in Zäkumflüssigkeit der Donortiere

Keime in KbE/g	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
aerober, mesophiler Bakterien	$4,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$7,5 \times 10^5$
aerober, gramnegativer Bakterien	$1,4 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$
Anaerobier	$6,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$
sporenbildender Anaerobier	$3,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	k ¹
Clostridium spp.	k ¹	k ¹	k ¹
Bacteroides spp.	k ¹	k ¹	k ¹
Enterococcus spp.	$7,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$
Lactobacillus spp.	$7,5 \times 10^7$	k ¹	6×10^5
Bifidobacterium spp.	k ¹	k ¹	2×10^7
Hefen	k ¹	$3,0 \times 10^3$	k ¹

k¹ nicht nachweisbar (< 10³)

Die *Endotoxine* wurden in der Caesitec-Studie für die Versuche 2 und 3 und die Tage 5 bis 9 sowie an den Tagen 5 und 7 jeweils 12 Stunden ppr. erfasst (siehe Anhang Tab. 27). Ein posthoc-Test konnte für die Versuche nicht durchgeführt werden, weil weniger als 3 Gruppen vorlagen. Im Vergleich der Tage untereinander war die Konzentration an Tag 5 signifikant niedriger ($p < 0,05$) als an den Tagen 6 und 8 (siehe Abb. 14). Die Konzentration der Endotoxine stieg im Mittelwertvergleich jeweils nach der Fütterung von 12 Stunden ppr. bis 24 Stunden ppr. ($p > 0,05$) an und sank nach 48 Stunden ($p > 0,05$) wieder ab. Dieser Dynamik folgten die Werte von Versuch 2, während V3 schneller und in der Reaktion geringer reagierte. Hier erreichte die Endotoxinkonzentration jeweils 12 Stunden ppr. ihren Höhepunkt und fiel danach wieder ab.

Ergebnisse

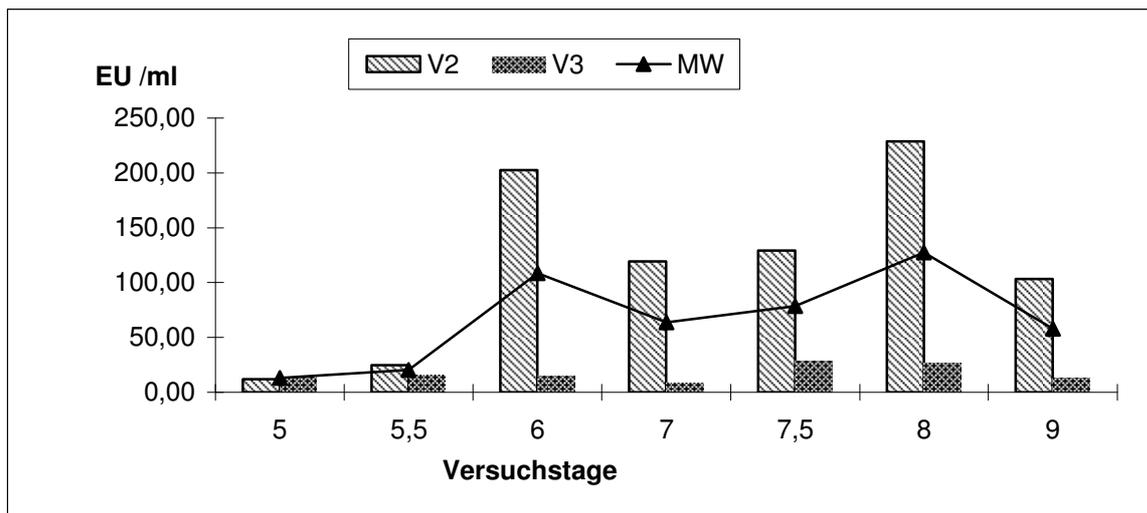


Abb. 14: Mittelwerte der Endotoxinkonzentration (EU/ml) der Probenfermenter der Caesitec-Versuche 2 und 3 (V2, V3) und des Mittelwertes (MW)

In der HGT-Studie wurden keine Proben zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration entnommen.

4.3 fermentative Gasbildung

Im folgenden Text werden die Ergebnisse der quantitativen Gasmessung der Caesitec-Studie und HGT-Versuche aufgelistet. Die Ergebnisse der qualitativen Gasanalyse beider Versuchsmethoden schließen sich daran an.

4.3.1 Gasvolumen

In der Caesitec-Studie wurde aller 24 Stunden das Gasvolumen erfasst. Beide Haupteffekte hatten einen signifikanten Einfluss auf die Gasmenge. Das in der Einstellphase der Versuche gemessene Gasvolumen schwankte im Mittelwert um 429 ± 195 ml in den Probenfermentern und um 424 ± 133 ml in den Blindfermentern. Die Gasproduktion der Blindfermenter blieb über die gesamte Versuchsdauer ($p > 0,05$) konstant bei 501 ± 180 ml im Mittelwert (siehe Abb. 15). Nach beiden Konzentratgaben kam es im Mittelwertvergleich in den Probenfermentern zu einem hochsignifikanten Anstieg ($p < 0,01$) der produzierten Gasmenge (siehe Tab. 11). Der Ausgangswert wurde in beiden Provokationen 48 Stunden ppr. annähernd wieder erreicht (siehe Abb. 15). Die zweite Konzentratgabe führte zu einer numerisch höheren Nett-Gas-Produktion gegenüber der ersten Raftilosegabe ohne signifikanten Unterschied zu dieser.

Ergebnisse

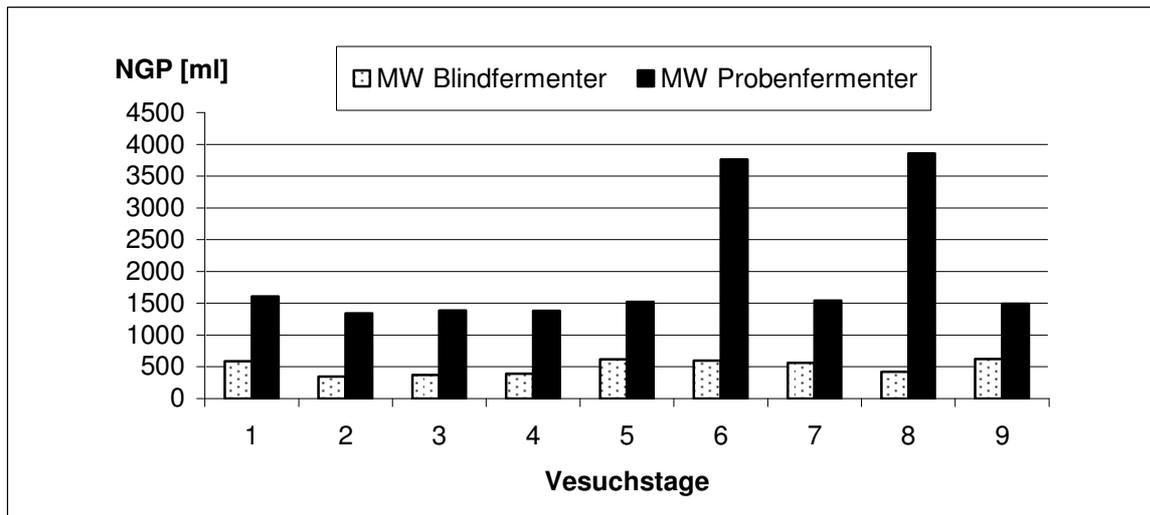


Abb. 15: Mittelwerte der Netto-Gas-Produktion (NGP in ml) der Probenfermenter und der Blindfermenter aller Caesitec-Versuche

Die Analyse der Einzelversuche ergab hochsignifikante Unterschiede zwischen allen Durchläufen, obwohl die Dynamik der Gasproduktion äquivalent verlief und nur die Stärke der Reaktionen zwischen den Versuchen unterschiedlich ausfiel.

Nach der 2-faktoriellen Varianzanalyse der HGT-Versuche wurde festgestellt, dass Versuch, Inokulum und Substratqualität einen signifikanten Einfluss ($p < 0,01$) auf den Endwert (18 bzw. 19 h) der Netto-Gas-Produktion hatte (siehe Tab. 13). Die Gasproduktion der Blindwerte der Substrate und Inokula unterschieden sich von den Inkubationen mit Zäkuminhalt und Substrat hochsignifikant, außer von der Messung des Ansatzes der Zäkumfestphase mit Heu ($p > 0,05$). In allen drei HGT-Versuchen wurde sowohl bei der Substratkombination ($p < 0,01$) als auch bei Heu ($p < 0,01$) allein bei der Inkubation mit flüssiger Zäkumphase eine höhere Netto-Gas-Produktion gemessen als im Ansatz mit Zäkumfestphase (siehe Abb. 16). Die Inkubation von Heu wies in beiden Inokula ($p < 0,001$) eine niedrigere Netto-Gas-Produktion auf als die Substratkombination.

Die statistische Betrachtung der Netto-Gas-Produktion pro 100 mg Substrat ergab die gleichen Ergebnisse wie die Netto-Gas-Produktion.

Ergebnisse

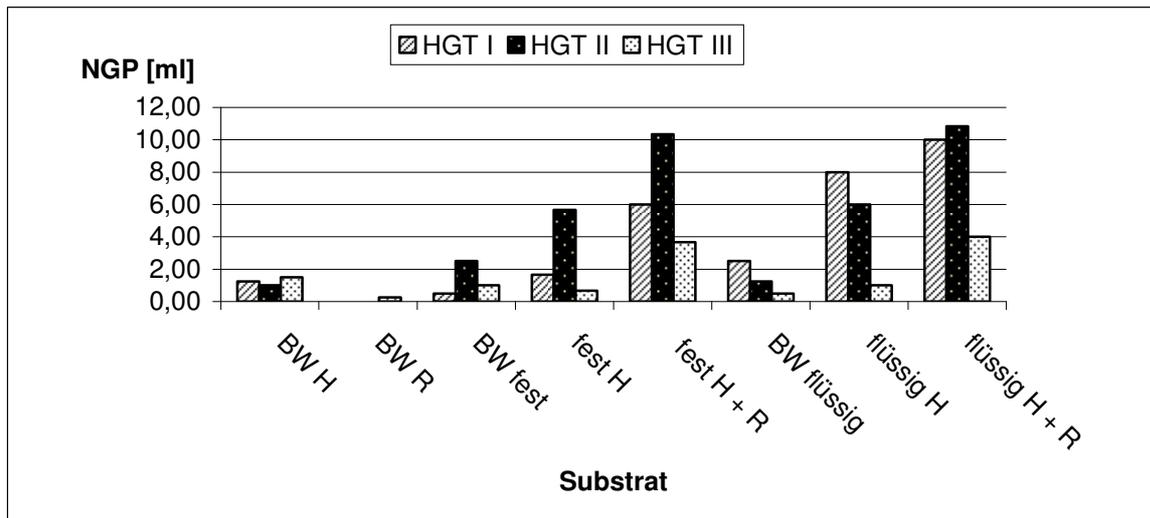


Abb. 16: Mittelwerte der Netto-Gas-Produktion (NGP in ml) der Substratblindwerte der einzelnen HGT-Versuche (HGT I, HGT II, HGT III)

BW.....Blindwerte
H.....Heu

Flüssig.....Zäkumflüssigphase
R.....Raftilose

Fest.....Zäkumfestphase

Eine genauere Betrachtung der Dynamik der Gasbildung mittels 3-faktorieller Varianzanalyse (Versuch, Zeit, Substrat) wird im folgenden Abschnitt erläutert. Dabei wurden die absoluten Werte (0; 3; 6; 18/19 h) und die Zeitintervalle (0; 0-3; 3-6; 6- 18/19 h) jeweils in ml der produzierten Gasmenge und zusätzlich pro 100 mg Substrat sowie pro Stunde (siehe Tab. 14) betrachtet.

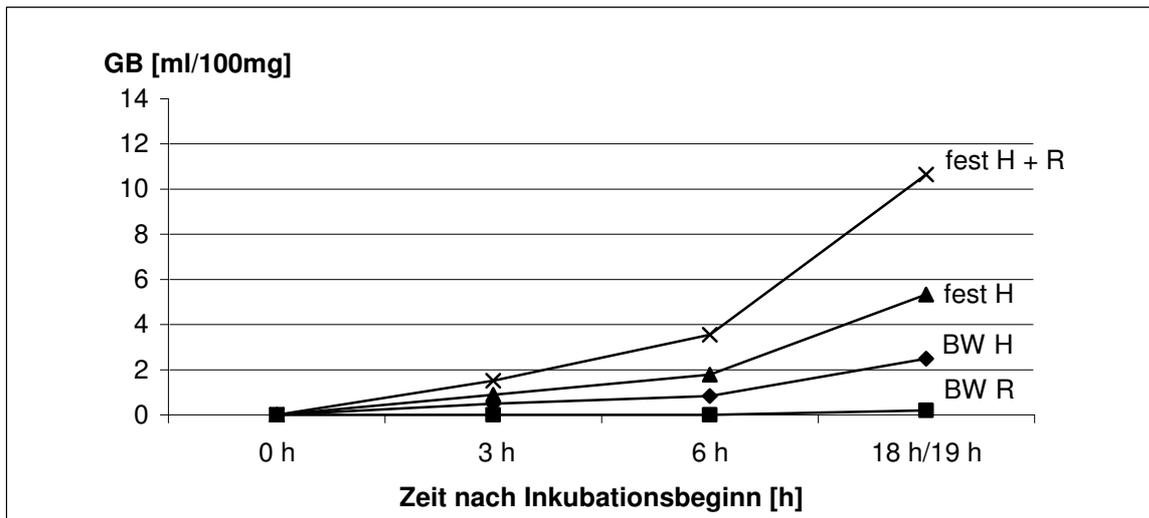
Gasbildung in ml

Die Substratqualität, die Inokulumvariante (fest oder flüssig) und die Messzeiten hatten jeweils einen hochsignifikanten Einfluss ($p < 0,001$). HGT III unterschied sich hochsignifikant von den beiden anderen Durchläufen (siehe Tab. 14).

Gasbildung in ml pro 100 mg Substrat

Auch pro 100 mg Substrat wurde bei der Gasbildung ein hochsignifikanter Effekt ($p < 0,001$) der Messzeit, der Inokulumvariante sowie innerhalb eines Inokulums und den Substraten (siehe Tab. 14) oder zu den jeweiligen Blindwerten nachgewiesen. Versuch III unterschied sich hochsignifikant von den früheren Durchläufen. In den folgenden Abbildungen ist die stärkere Gasbildung bei Inkubation der Substratkombination im Vergleich zur Heuinkubation und den Substratblindwerten sowohl in der Flüssig- (Abb. 17) als auch in der Festvariante (Abb. 17) Zäkumphasen dargestellt.

Ergebnisse

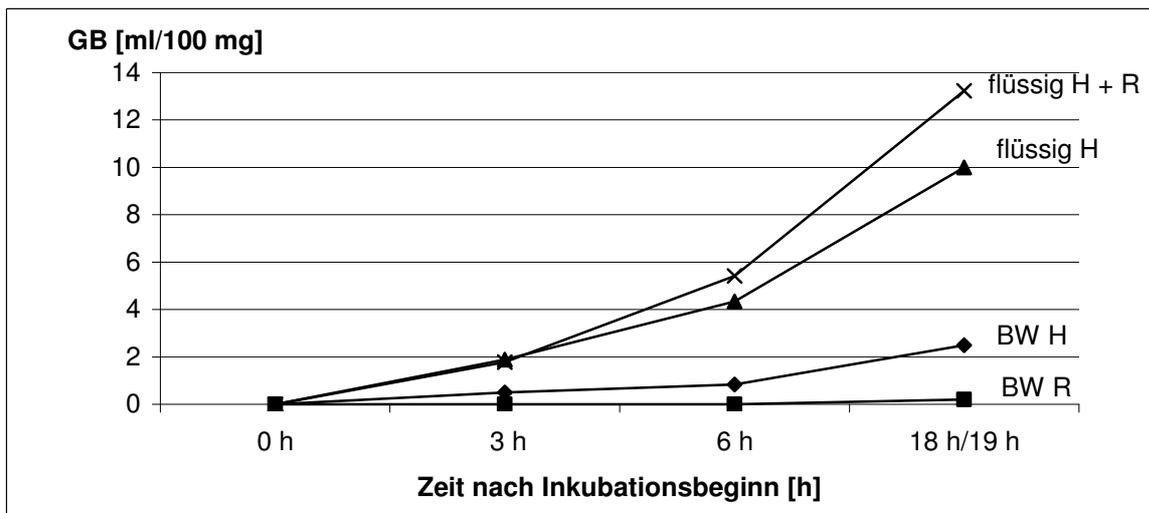


BW.....Blindwerte
H.....Heu

Flüssig.....Zäkumflüssigphase
R.....Raftilose

Fest.....Zäkumfestphase

Abb. 17: Verlauf der Gasbildung (GB ml/ 100 mg Substrat) bei der Inkubation der Zäkumfestphase als Mittelwerte aller HGT-Versuche (signifikante Effekte siehe Tab. 14)



BW.....Blindwerte
H.....Heu

Flüssig.....Zäkumflüssigphase
R.....Raftilose

Fest.....Zäkumfestphase

Abb. 18: Verlauf der Gasbildung (GB ml/ 100 mg Substrat) bei der Inkubation der Zäkumflüssigphase als Mittelwerte aller HGT-Versuche (signifikante Effekte siehe Tab. 14)

Gasbildung im Intervall in ml pro 100 mg Substrat

Pro 100 mg Substrat ergaben sich hochsignifikante Effekte bei der Gasbildung innerhalb der Intervalle (siehe Tab. 14) sowie der Substratqualität innerhalb eines Inokulums und des Inokulums bei gleicher Substratinkubation. Die Versuche unterschieden sich hochsignifikant voneinander.

Ergebnisse

Gasbildung im Intervall in ml pro 100 mg Substrat und pro Stunde

Versuch III unterschied sich hochsignifikant von den beiden anderen HGT's. Die Messzeiten t_0 und t_2 unterschieden sich voneinander und jeweils den anderen Messintervallen hochsignifikant (siehe Tab. 14). Innerhalb eines Inokulums hatte die Substratqualität einen signifikanten (Zäkumflüssigphase) oder hochsignifikanten Effekt (Zäkumfestphase) auf die Gasbildung im Intervall pro 100 mg Substrat und Stunde. Die Inokula unterschieden sich bei gleicher Substratbeigabe hochsignifikant ($p < 0,001$).

4.3.2 Gaszusammensetzung

In beiden Studien wurde zur Beschreibung der Gaszusammensetzung die Wasserstoff- und Methankonzentration sowie zur Veranschaulichung der Wasserstoff-Methan-Quotient berechnet erfasst. In der grafischen Darstellung wurden nur Versuchstage mit gleicher Stichprobengröße (Tag 3- 7) verwendet. Eine Abweichung von der Grundgesamtheit ergibt sich aufgrund der Überlagerung der Versuchstage 7 und 8 in Versuch 1 (siehe Methodenteil 3.2.1).

4.3.3 Wasserstoffkonzentration (H_2)

In der varianzanalytischer Betrachtung der Ergebnisse der Caesitec-Methode hatten weder das Substrat noch der Versuch einen signifikanten Effekt auf die Wasserstoffkonzentration in der Fermenterflüssigkeit. In der Einstellperiode schwankte die Konzentration in den Probenfermentern im Mittelwertvergleich zwischen 16,95 und 189,32 $\mu\text{mol/l}$ und in den Blindfermentern zwischen 17,56 und 196,27 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 19). Dieser Schwankungsbereich blieb in den Blindfermentern über die gesamte Versuchsdauer ($p > 0,05$) erhalten (siehe Anhang Tab. 13). Im Mittelwertvergleich der Probenfermenter stieg die Konzentration nach der ersten Provokationsfütterung von Tag 6 auf Tag 7 numerisch an und fiel dann bis Tag 9 annähernd auf den Ausgangswert zurück. In der Analyse der einzelnen Versuche fiel auf, dass sich die Versuche 1 und 3 von V2 signifikant unterschieden. In Versuch 1 und 3 war die Produktionssteigerung von Wasserstoff deutlich weniger ausgeprägt als in Versuch 2.

Ergebnisse

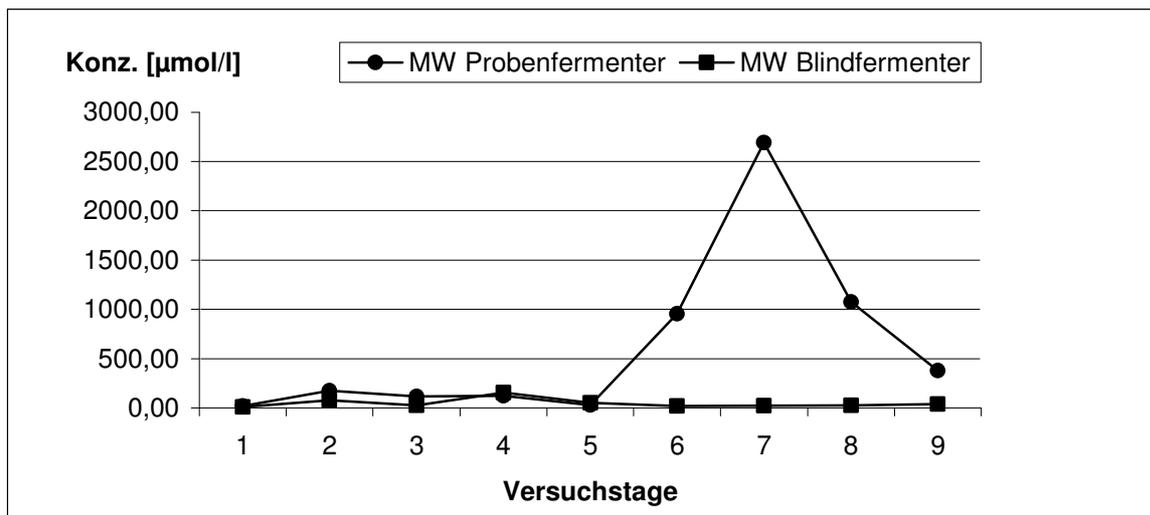


Abb. 19: Mittelwerte der Wasserstoffkonzentration (H_2) in $\mu\text{mol/l}$ in produzierter Gasmenge der Probenfermenter und Blindfermenter der Caesitec-Versuche

Die in der HGT-Studie messbare Konzentration an Wasserstoff wurde vom Haupteffekt Versuch signifikant beeinflusst (siehe Tab. 13). Die Substratgaben hatten keinen signifikanten Effekt. Bei der Inkubation von festem Zäkuminhalt waren jedoch tendenziell höhere Werte bei Substratzulage als im Blindwert messbar und die Variante mit der Substratkombination wies eine stärkere Wasserstoffproduktion als die Variante mit Heu allein auf (siehe Anhang Tab. 49).

4.3.4 Methankonzentration (CH_4)

Auf die Produktion von Methan hatten die Substratgaben in der Caesitec-Studie keinen signifikanten Effekt. In der Caesitec-Einstellphase schwankte die Methankonzentration in den Blindfermentern und Probenfermenter stark (siehe Abb. 20). Ab Tag 3 stieg die Konzentration in den Blindfermentern ($p > 0,05$) an. Zwischen Tag 3 und Tag 5 stieg die Konzentration von Methan in allen Probenfermentern und erreichte im Mittelwertvergleich an Tag 5 einen zu Tag 1 signifikanten Höhepunkt ($3401,71 \pm 2618,78$; $p < 0,05$). In den Probenfermentern war 24 Stunden nach der ersten Fütterung ein signifikanter Konzentrationsabfall von Methan messbar. Im weiteren Verlauf stieg der Methanwert stetig an, wobei nach der zweiten Raftilosegabe kurzzeitig ein leichter nicht signifikanter Konzentrationsabfall beobachtet wurde (siehe Anhang Tab. 14).

Ergebnisse

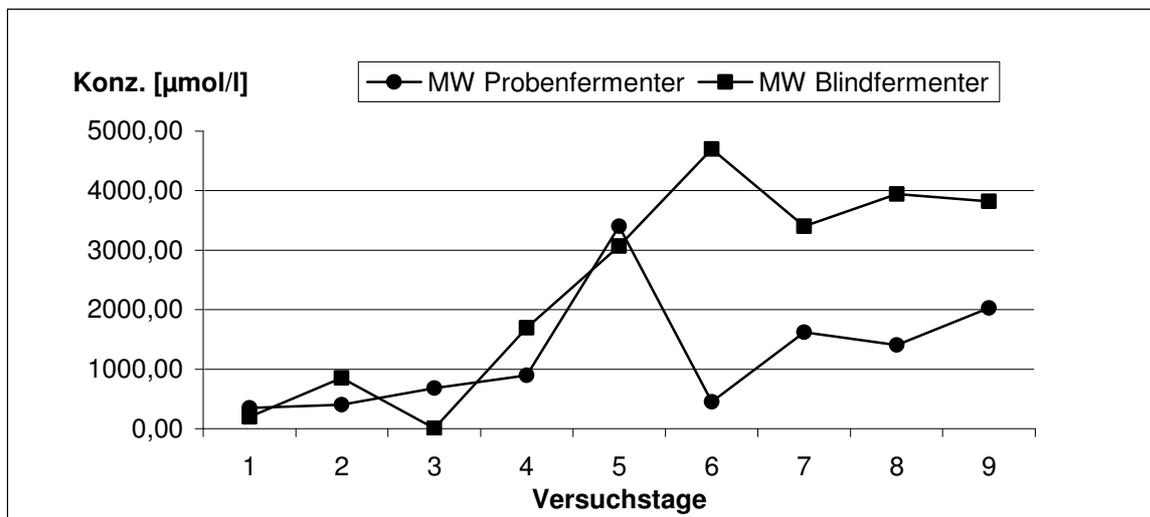


Abb. 20: Mittelwerte der Methankonzentration (CH_4) in $\mu\text{mol/l}$ in produzierter Gasmenge der Probenfermenter und Blindfermenter der Caesitec-Versuche

Bei der Analyse der einzelnen Versuche unterschieden sich V2 und V3 signifikant voneinander (siehe Anhang Abb. 7). Während Versuch 1 und 2 der im Mittelwertvergleich beschriebenen Dynamik folgten, stieg die Methankonzentration in V3 48 Stunden nach der ersten Fütterung nicht wieder an. Nach der zweiten Gabe von Raftilose erhöhte sich die Konzentration des Gases innerhalb der ersten 24 Stunden und sank nach 48 Stunden wieder ab.

Die Substratqualität hatte auf die in der HGT-Studie gemessene Methankonzentration keinen signifikanten Einfluss. Die Messungen der Inkubation von Zäkumflüssigphase mit Heu unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$) zu denen der Inkubation der Substratkombination mit Flüssigphase und hochsignifikant ($p < 0,001$) von allen anderen Ansätzen. Die gemessene Konzentration an Methan aus den Ansätzen dieses Inokulums mit der Substratkombination unterschied sich zum Heublindwert signifikant (siehe Tab. 13). Der Haupteffekt Versuch hatte auf die Methankonzentration einen signifikanten Einfluss.

4.3.5 Wasserstoff-Methan-Quotient ($\text{H}_2:\text{CH}_4$)

Aufgrund der Provokationsfütterung von Raftilose und der zu erwartenden Zunahme der Wasserstoffproduktion wurde zur Veranschaulichung ein Wasserstoff-Methan-Quotient berechnet.

Die Fütterung von Raftilose und der Versuchsdurchlauf hatten auf den Wasserstoff-Methan-Quotienten ($\text{H}_2:\text{CH}_4$) in der Caesitec-Studie keinen signifikanten Einfluss (siehe Tab. 11). Der Wert stieg nach der ersten Fütterung stark an und fiel nach 48 Stunden bis Tag 9 wieder auf

Ergebnisse

den Ausgangswert zurück. Die zweite Fütterung führte zu keinem erneuten Anstieg. In Abbildung 21 ist das Verhältnis von Gasvolumen und Wasserstoff-Methan-Quotienten an dargestellt. Diese Darstellung verdeutlicht, dass nach der zweiten Raftilosegabe trotz steigendem Gasvolumen der Anteil von Wasserstoff im Gasgemisch abnimmt. Die Einzeldaten sind dem Anhang Tab. 15 zu entnehmen.

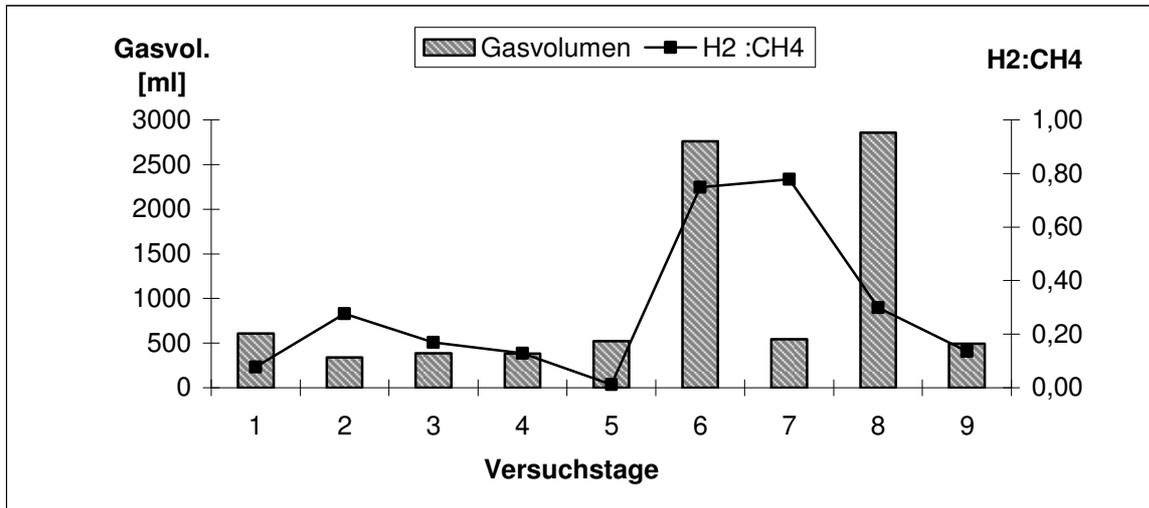


Abb. 21: Mittelwerte des produzierten Gasvolumens (ml) und der Wasserstoff-Methan-Quotienten (H₂:CH₄) der Probenfermenter der Caesitec-Studie an den Versuchstagen 3 bis 7

Der Wasserstoff-Methan-Quotienten der HGT-Studie konnte aufgrund einer zu geringen auswertbaren n-Zahl nicht statistisch ausgewertet werden (siehe Anhang Tab. A50).

V DISKUSSION

5.1 Kritik der Methode

Im Folgenden soll die Vorgehensweise dieser Studie kritisch betrachtet werden.

5.1.1 Raftilose als Modell für natürliche Grasfruktane

Der in dieser Studie verwendete Zucker ist ein kurzkettiges Fruktooligosaccharid (short chain: scFOS) mit Handelsnamen Raftilose P95 (Boneo™). Das Produkt wurde aufgrund seiner Zusammensetzung von ausschließlich kurzen Ketten mit maximal 2 – 8 Molekülen ausgewählt. CRAWFORD verwendete für die Studien 2007 Inulin (Boneo™) mit einem Polymerisationsgrad von 2- 60, demzufolge ein langkettiges FOS. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Studie von ROSSI et al. (2005), in der sich 55 untersuchte Bifidobakteriumstämme auf scFOS (Raftilose P95) und nur 8 Spezies auf Inulin (Raftiline HP) vermehrten, wurde gegen das Produkt Inulin (Boneo™) und für die Verwendung von scFOS entschieden. Bei der Studie von ROSSI et al. (2005) handelte es sich allerdings um Bifidobakterien aus Mensch, Ratte, Schwein und Rind. Ähnliche Ergebnisse beschrieben auch WANG und GIBSON (1993) oder ROBERFROID et al. (1998) beim Menschen. Eine Übertragbarkeit auf die Fähigkeiten der Spezies im Pferdedarm bleibt Spekulation.

RESPONDEK et al. (2007) bezweifelten große Mengen an Bifidobakterien oder Laktobazillen im equinen Dickdarm. Dies widerlegen die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung (siehe Kap. 4.2.7) der hier vorliegenden Arbeit. Es wurden sowohl Laktobazillen (V 1, 3) als auch Bifidobakterien (V 3) nachgewiesen. Auch andere Studien belegten die Besiedlung des equinen Darmes mit Laktobazillen (BAILEY et al. 2003, JULLIAND et al. 2001, AL JASSIM et al. 2005) und Bifidobakterien (ENDO et al. 2007, GAVIVI et al. 2006). Weitere Untersuchungen zur bakteriellen Besiedlung des equinen Zäkums sind bezüglich dieser Fragestellung dringend nötig.

Raftilose P95 diente zahlreichen Studien (POLLITT et al. 2003, THOEFFNER, 2004, MILINOVICH et al. 2006, VAN EPS und POLLITT 2006) als Modellfruktan für eine alimentär bedingte Laminitis, obwohl sich diese Oligofruktose zu dem in Gräsern nachgewiesenen Fruktan vom Levan-Typ strukturell unterscheidet. Es ist ein lineares Molekül mit β -2,1-Bindung, während das Grasfruktan eine durch β -2,6-Bindungen verzweigte Struktur aufweist (VIJN und SMEEKENS, 1999). Aufgrund dieser Unterschiede kommt es bei der

Diskussion

mikrobiellen Fermentation im equinen Dickdarm sicherlich zu Abweichungen vom Levan-Typ.

Diverse Studien widmeten sich daher dem Vergleich der Abbaubarkeit von Fruktanen vom Inulintyp und/oder Levantyp durch unterschiedliche Bakterien. Nach MUSCHNICK (1998) können Pilze und Bakterien Fruktane mittels Endohydrolasen und Transferasen abbauen. Auch DUNCAN et al. (2003) und ROSSI et al. (2005) beobachteten, dass Firmicutes, Bacteroides und Bifidobacteriales scFOS oder Inulin nutzen können. GÄNZLE und FOLLADOR (2012) beschrieben den Oligosaccharidmetabolismus der Laktobazillen. In ihren Ausführungen stellten sie deren Fähigkeiten Levane, Inulin und andere Oligosaccharide intra- oder extrazellulär umzusetzen dar. SONNENBURG et al. (2010) stellten fest, dass die Verdopplungsrate von *B. thetaiotaomicron* auf Levan-Nährboden höher war als auf Inulin-Nährboden. Diese Bakterien waren in der Lage, in abnehmender Reihenfolge Levane, scFOS und Inulin umzusetzen.

Diese Vergleiche stärken also die Entscheidung scFOS als Modellfruktan zu nutzen, wenn extrahierte Levane nicht zur Verfügung stehen. CRAWFORD (2007) rechtfertigte den Einsatz von extrahierten Fruktanen (Inulinen oder scFOS) aus der Chicoréewurzel, als Modellfuttermittel für eine Weide-assoziierte Laminitis. So könnten diese als Beispiel für Stärke, Zucker und Fruktane dienen, welche schnell unter Laktatbildung fermentiert werden. CRAWFORD (2007) stellt richtig fest, dass für eine Verwendung von Grasfruktanen in der Wissenschaft eine Extraktion dieser Zucker in großen Mengen nötig wäre. Für weitere Studien stellt dies trotz enormer Kosten eine sinnvolle Ergänzung dar.

Die in der vorliegenden Arbeit zugesetzte Bolusmenge des Raftilosepulvers (~ 7,5 g/kg LM) orientierte sich am Stand der Literatur. In in vivo-Experimenten wurden zwischen 3 g (CRAWFORD et al. 2007), 7,5 g (VAN EPPS und POLLITT 2006) und 10 g (MILINOVICH et al. 2006) Raftilose pro kg LM als Bolus verwendet, um Laminitis auszulösen.

Beispielrechnung:

Bei einer täglichen Trockensubstanzaufnahme von 2 - 2,5% der Lebendmasse (MEYER und COENEN 2002) muss ein Pferd (500 kg LM) 12,5 kg TS Gras fressen. Um eine Laminitis auslösende Menge an Fruktanen (7,5 g/kg LM oder 3,75 kg) aufzunehmen, müßte das Gras mindestens 300 g Fruktan pro kg TS enthalten ($7,5 \text{ g/kg TS} \times 500 \text{ kg LM} : 12,5 \text{ kg TS}$).

Diese Fruktankonzentrationen sind in einigen Grassorten unter bestimmten klimatischen Bedingungen durchaus zu erreichen. In Deutschland wurden je nach Witterung und Standort

Diskussion

Konzentrationen zwischen 18 und 57 g/kg TS (VERVUERT et al. 2006), in Großbritannien 75 bis 279 g/kg TS (LONGLAND und BYRD 2006) und in Frankreich bis 400 g/kg TS (VOLAIRE u. LELIEVRE et al. 1997) nachgewiesen. Die höchsten Fruktangehalte wurden in kultivierten Hochleistungsgräsern (deutsches Weidelgras, Wiesenschwingel, Knäulgras, Lieschgras) von LONGLAND und CAIRNS (2000) gemessen. Welchen Anteil solche Grassorten in der Weidevegetation oder am Grasschnitt für die Stallhaltung ausmachen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Diese großen Fruktanmengen wurden in der eigenen Studie wie auch in früheren Arbeiten (MILINOVICH et al. 2006, VAN EPPS und POLLITT 2006, CRAWFORD et al. 2007) stets als Bolus, also auf ein Mal, verabreicht. In der Weidepraxis ist die Aufnahme einer solchen Menge nur über den Tag verteilt möglich. Wie diese längere Fruktanaufnahmezeit sich auf die Mikroflora des Verdauungstraktes auswirkt, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

5.1.2 Spendertiere

Die eigenen Untersuchungen veranschaulichen die Relevanz der Herkunft der Inokula für die erzielten Ergebnisse. In vielen in vivo-Untersuchungen wurden Einflüsse des Alters der Spendertiere (SASAKI et al. 1999) und des Fütterungsmanagements (RESPONEK et al. 2008) aufgeführt. In der vorliegenden Studie erfolgte daher eine Vorauswahl der Spendertiere nach Alter (über 3 Jahre, hier: 7 bis 19 Jahre) und Anamnese (ohne Magen-Darm-Erkrankung oder Hufrehe). Im Vergleich der verwendeten Zäkuminhalte der vorliegenden Studie fallen trotz dieser Vorauswahl beträchtliche Unterschiede sowohl im pH-Wert, in der Titrationsazidität und im Trockensubstanzgehalt als auch im Roh Nährstoffgehalt (siehe Anhang Tbl. 4) auf. Um diese Einflüsse früherer Futtermittel zu minimieren und weitestgehend einheitliche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde im Caesitec eine Adaptationszeit von 5 Tagen gewährleistet. In dieser Zeit wurden alle Fermenter gleich behandelt (Heufütterung). Dies wurde in anderen in vivo und in vitro Studien durch eine sogenannte Wash-out- oder Adaptationsphase gewährleistet. Dennoch zeigten sich in der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede zwischen Fermentern unterschiedlicher Donortiere (z.B. Azetat-, Propionat-, Wasserstoff-, Methanproduktion).

Die in der eigenen Studie beobachtete starke Schwankungsbreite der Methanproduktion zwischen den Inokula einzelner Spenderpferde belegt die Individualität der methanogenen Flora. Eine Altersabhängigkeit der Kapazität der Methanproduktion beschrieben schon SASAKI et al. (1999). Sie beobachteten mittels Exhalationstest, die Ansiedlung der Methanbildenden Spezies im Darm innerhalb der ersten 3 Lebensjahre. Da die in der vorliegenden

Diskussion

Arbeit verwendeten Donortiere aber älter waren, scheinen weitere Faktoren, beispielsweise frühere Antibiotikatherapien, eine Rolle zu spielen. Um solche Einflussfaktoren in weiteren Studien minimieren zu können, müsste die Auswahl der Spendertiere nicht nur im Hinblick auf Fütterungsmanagement und Futtermittel erfolgen. Mögliche weitere Kriterien könnten gleiche Bestandszugehörigkeit innerhalb der ersten Lebensjahre oder die Zeitspanne zur letzten antibiotischen Behandlung sein. Aufgrund der begrenzten Anzahl und mangelnder Auswahlmöglichkeit von Schlachtpferden scheint dies aber nicht realisierbar.

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle auf eine weitere Möglichkeit der Gewinnung geeigneter Inokula verwiesen. Die Verwendung Zäkum-fistulierter Versuchstiere ließe eine Auswahl der Spendertiere aus gleichen Fohlenbeständen und eine langfristige Anpassung des Fütterungsmanagements auf die Fragestellung der jeweiligen Caesitec-Studie zu. Jedoch stellt diese Methode aufgrund der Tierschutzrelevanz eine wenig sinnvolle Alternative dar.

5.1.3 Versuchsdesign

Nach der Analyse der Parameter des ersten Versuches der Caesitec-Studie erfolgte in den Versuchen 2 und 3 eine Vorverlegung der wiederholten Raftilosegabe von Versuchstag 8 auf Versuchstag 7. Als Begründung wurde auf die annähernde Angleichung der Messwerte an die Ausgangsbedingungen nach der Adaptationsphase verwiesen (Anhang Tab. A 01). Mögliche signifikante Unterschiede zwischen Versuch 1 sowie Versuch 2 und 3 waren nicht auf diese veränderte Ablesezeit zurückzuführen. Dies kann im Kapitel Ergebnisse in Tab. 11 und 12 nachvollzogen werden.

In der HGT-Studie kamen aus arbeitsorganisatorischen Gründen unterschiedliche Endzeiten der einzelnen Durchläufe zur Auswertung. Daher übte der Haupteffekt Versuch einen signifikanten Einfluss auf die Parameter in der Kolbenflüssigkeit aus. In der Betrachtung der Dynamik der Gasbildung (GB) und der Netto-Gas-Produktion (NGP) wurde eine Abschlusszeit von 18h in HGT I und II und 19h in HGT III gewählt. Trotz dieser Angleichung ergab sich meist ein signifikanter Unterschied (Tab. 17) zwischen den beiden ersten und dem dritten HGT. In weiteren Studien ist daher unbedingt auf identische Ablese- und Endzeiten zu achten.

5.1.4 Methode zum Nachweis von Endotoxinen

Die zum Nachweis von Endotoxinen in der Probenflüssigkeit verwendete Methode beinhaltete eine Hitzeinaktivierung (10 min, 75°C) der Bakterien. Bei einer solchen Erhitzung kann eine Zerstörung von Zellwandbestandteilen der Bakterien nicht ausgeschlossen werden.

Diskussion

Im Verlauf der vorliegenden Studie war ein Anstieg des Anteils von gram-negativen Bakterien in der Fermenterflüssigkeit zu erwarten. Gram-negative Spezies besitzen eine dünnere Zellwand als gram-positive Arten. Durch Stress wird diese zerstört und in der Wand enthaltene Endotoxine werden frei. Stressoren können unter anderem Antibiotika, Detergentien, Ansäuerung des Milieus oder eben Hitzeeinwirkung sein. Das in der vorliegenden Arbeit in der Probenflüssigkeit nachgewiesene Endotoxin setzt sich also aus freiem LPS bereits im Fermenter zugrundegegangener Bakterien und von durch Hitzeanwendung aus der Zellwand gelösten Toxinen von bis dahin intakten Bakterienzellen zusammen. Welchen Anteil die Raftilosegabe und Ansäuerung des Milieus an der Endotoxinsteigerung hatte, ist nicht nachzuvollziehen. In weiteren Studien ist daher ein Nachweisverfahren ohne Hitze zu empfehlen.

5.1.5 Übertragbarkeit der Ergebnisse der in vitro-Methode Caesitec auf in situ-Bedingungen im equinen Zäkum

Die im Caesitec gewonnenen Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf die Fermentationsdynamik, Metabolitenkonzentrationen und Floraveränderungen in verschiedensten Fütterungssimulationen zu. Vor dem Hintergrund der Übertragbarkeit auf den Wirtsorganismus muss der Caesitec wie jedes anderen in vitro-System kritisch betrachtet werden. Denn es besteht weder die Möglichkeit der Beobachtung der Interaktion von bakterieller Flora, Darmepithel und Immunsystem noch die Auswirkungen der Verschiebung der Metabolitenkonzentrationen auf die Mukusdicke im Darm oder den Gesamtorganismus zu prüfen. Genau dies scheint aber, wie JOHANNSON et al. (2011) beschrieben, entscheidend für die Entstehung von Krankheit zu sein. Diese Arbeitsgruppe wies den Einfluss der durch Bakterienflora variierenden Mukusdicke auf die Barrierefunktion des humanen Kolonepithels nach. Die Einflussfaktoren der Epithelbarriere, wie beispielsweise die Dichte der Zellverbindungen (tight junctions), Cytochrom P450-Enzyme oder die ankergebundene alkalische Phosphatase sowie des darin enthaltenen Immunsystems mit der Aktivität von neutrophilen Granulozyten, Immunglobulin A und der Phagozytoserate auf die Magendarmbakterien dürfen nicht vernachlässigt werden (MACFARLANE und MACFARLANE 2004, HOFMANN und ECKMANN 2006). Hinzu kommen die Einflüsse der Darmanhangsdrüsen Leber und Bauchspeicheldrüse, die das bakterielle Wachstum im Darm durch Proteasen, Esterasen, Gallensäuren oder akute-Phase-Proteine begrenzen. Gallensäuren wirken beispielsweise direkt, durch die Bindung von Toxinen (KOCSÁR et al. 1969, BERTÓK 1998) und indirekt mit Hilfe der Farnesoid X-Rezeptors (INAGAKI et al.

Diskussion

2006). Die antibiotische Wirkung von konjugierten bzw. dekonjugierten Gallensäuren scheint jedoch auf den Dünndarm beschränkt zu sein. Denn durch die Rückresorption der Säuren spätestens im Ileum (enterohepatischer Kreislauf) ist der Dickdarm aus ihrem Wirkungsbereich weitestgehend ausgeschlossen (NORTHFIELD and MCCOLL 1973). Es gibt also vielschichtige Einflüsse auf die bakterielle Darmflora sowie deren Weg aus dem Darm in den Organismus oder die Entstehung von Krankheiten resultierend aus einem bakteriellen Ungleichgewicht. EVERARD et al. (2013) beschrieben den Zusammenhang zwischen der Entstehung von Diabetes mellitus Typ II beim Nagetier und der Anwesenheit einzelner Bakterien (*Akkermansia muciniphila*) sowie deren Auswirkung auf die Schleimschichtdicke. RIDAURA et al. (2013) wiesen den Kontext von Adipositas und Bakterienflora im Mäusedarm sowie eine beginnende Insulinresistenz der Nager nach 15 Tagen Kolonisation mit Darmbakterien adipöser humaner Spender nach.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Durchläufe der hier vorliegenden Studie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die individuell variierenden Bakterienspezies (inklusive pH, Titrationsazidität, Metabolite) der Spenderpferde zurückzuführen. Nur die Untersuchung der Auswirkungen der Bakterienflora und deren Metabolite auf das Darmepithel lassen endgültige Rückschlüsse auf die Entstehung von Krankheiten wie beispielsweise Adipositas, Insulinresistenz, Diabetes mellitus oder eben Hufrehe zu.

Im Hinblick auf die Erforschung alimentär bedingter equiner Laminitis scheint daher eine begrenzte Anzahl an Tierversuchen unerlässlich.

5.2 Erörterung der eigenen Ergebnisse

Die Erörterung der eigenen Ergebnisse erfolgt getrennt nach den angewendeten in vitro-Verfahren. Bei der Betrachtung der Caesitec-Studie wird nochmals unterteilt in einmalige und wiederholte Provokationsfütterung.

5.2.1 Einfluss der einmaligen Raftilosegabe auf die Fermentation in vitro (Caesitec)

Vor der Zulage von Raftilose zur täglichen Heuration wurde anhand der Parameter der Fermenterflüssigkeit geprüft, ob verglichen mit in vivo-Heufütterung äquivalente Metabolitenkonzentrationen messbar waren.

Adaptationsphase

Nach der Adaptationsphase von 5 Tagen, in der individuelle Schwankungen durch

Diskussion

Spendertiere ausgeschaltet werden sollten, wurde ein pH-Wert von $6,82 \pm 0,195$ gemessen, welcher in der Literatur als physiologisch nach rohfaserreicher Fütterung betrachtet wird (WILLARD et al. 1977, JULLIAND et al. 2001, DE FOMBELLE et al. 2003, MILINOVICH et al. 2008). Auch die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren ($24 \pm 3,4$ mmol/l) entsprechen einem physiologischen Schwankungsbereich. SCHWABENBAUER et al. (1982) beobachteten mit steigendem Anteil an Rohfaser in der Ration (Alleinfutter und Hafer: 54,9 mmol/l vs. Stroh: 21,9 mmol/l) sinkende Fettsäurekonzentrationen. DE FOMBELLE et al. (2003) ermittelten eine Fettsäurekonzentration von 82,6 mmol/l, MEDINA et al. (2002) von 68,1 mmol/l nach rohfaserreicher Fütterung und JULLIAND et al. (2001) 85,2 mmol/l nach Heufütterung. Die Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren der eigenen Studie (Azetat $14 \pm 2,1$ mmol/l, Propionat $6 \pm 0,9$ mmol/l, i-Butyrat $0,1 \pm 0,1$ mmol/l, n-Butyrat $2 \pm 0,9$ mmol/l) spiegeln die Ergebnisse früherer Studien wider (SCHWABENBAUER et al. 1979). HINTZ et al. (1971) oder MEDINA et al. (2002) (Azetat 50,9 mmol/l, Propionat 12,8 mmol/l, Butyrat 3,6 mmol/l) ermittelten im Zäkum nach Heufütterung etwas höhere Konzentrationen.

Nach der Einstellphase wurden an Tag 5 verglichen mit bisheriger Literatur sehr niedrige Konzentrationen an Gesamtlaktat ($0,03 \pm 0,01$ mmol/l), L-Laktat ($0,02 \pm 0,01$ mmol/l) und D-Laktat ($0,01 \pm 0,01$ mmol/l) gemessen. So belegten DE FOMBELLE et al. (2003) im Zäkum 0,2 mmol/l D-Laktat und 0,1 mmol/l L-Laktat nach Raufuttergabe oder RESPONDEK et al. (2007) bis 1,14 mmol/l L-Laktat und 0,78 mmol/l D-Laktat nach Gabe einer Ration mit einem Raufutter-Konzentrat-Verhältnis von 30:70. Der in der eigenen Arbeit ermittelte Ammoniakgehalt der Fermenterflüssigkeit variierte an Tag 5 um $17,8 \pm 2,3$ mmol/l. Ähnliche Konzentrationen belegten auch VOSSMER et al. (2012) im Caesitec nach Inkubation mit diversen Grassorten. Der Endotoxingehalt in der Fermenterflüssigkeit der eigenen Studie wurde mit $13,1 \pm 4,3$ EU/ml an Tag 5 als relativ gering eingeschätzt. Eine ähnliche Konzentration wurde von LI et al. (2012) im Zäkum (16,51 EU/g) von Rindern gemessen.

Insgesamt kann also anhand der Messungen der Stoffwechselfparameter der Bakterienflora geschlussfolgert werden, dass in den Versuchsfermentern der vorliegenden Caesitec-Studie zum Zeitpunkt Tag 5 vergleichbare Bedingungen zum Milieu des equinen Zäkums vorlagen.

Erste Provokationsphase

In der vorliegenden in vitro-Studie wurde nach einer Adaptationsphase von 5 Tagen an Versuchstag 5 Raftilose zur täglichen Heuration zugelegt. Daraus resultierten folgende

Diskussion

Veränderungen (siehe Tab. 18) der analysierten Parameter pH-Wert, Laktat, Ammoniak, Gesamtfettsäuren und Fettsäuremuster sowie Gasvolumen und Gaszusammensetzung.

Tab. 18: Veränderungen der Parameter 24 Stunden nach Zugabe von Raftilose zur Heufütterung

	▲Steigerung▲	▼Reduktion▼
signifikant	Gesamtlaktat; D-Laktat; L-Laktat	pH-Wert
	Gasvolumen	Ammoniak
	Endotoxine	Methan
	Gesamtfettsäuren	n-Valeriat
	Propionat	
	n-Butyrat; n-Valeriat; n-Capronat	
numerische	Wasserstoff	Azetat
		i-Valeriat

Nach Verabreichung von Raftilose an Versuchstag 5 (pH $6,8 \pm 0,2$) kam es zu einer Azidierung der Fermenterflüssigkeit (pH $5,1 \pm 0,3$). Dies war offenbar durch die signifikante Steigerung saurer Metabolite wie Gesamtlaktat, D- und L-Laktat sowie der Gesamtfettsäurenkonzentration bedingt. Diese kurzzeitigen (24 h ppr.) Veränderungen der Stoffwechselprodukte der Mikroflora ließen auf eine Vermehrung säuretoleranter Laktat-Bildner wie Laktobazillen und Streptokokken schließen. Eine Bestätigung dieser These findet sich in den Ergebnissen diverser in vivo-Experimente mit Steigerung von löslichen Kohlenhydraten in der Ration (GARNER et al. 1978, ROWE et al. 1994, AL JASSIM et al. 2005, ONISHI et al. 2012) oder nach Inulinsubstitution (BERG et al. 2005, MILNOVICH et al. 2006) sowie nach in vitro-Inkubation von Inulin (1g/100ml) mit zäkalem Inokulum (BAILEY et al. 2002 und 2003). Auch HUNTINGTON und POLLITT (2002) beobachteten den drastischen Wechsel von einer dominierenden gram-negativen Bakterienkultur zu säuretoleranten gram-positiven Stämmen. KERN et al. (1973) oder MEDINA et al. (2001) beschrieben eine Zunahme der Bakterienanzahl im Pferdedarm nach Steigerung rasch fermentierbarer Kohlenhydrate in der Ration im Vergleich zur faserreichen Ration. MILNOVICH et al. (2008) beobachteten zusätzlich den Verlust der Speziesvielfalt. Die Proliferation der Streptokokkenspezies des Pferdedarms, so genannte „equine hindgut streptococcal species (EHSS)“, stellten für sie die Ursache der Metabolitverschiebung dar. Dabei wurde Streptococcus lutetiensis als dominierende und hauptsächlich Oligofruktose

Diskussion

fermentierende Spezies im equinen Verdauungskanal nach Laminitisauflösung durch Raftilose identifiziert.

Neben der Azidierung wurde die Steigerung der Laktatproduktion (LONGLAND und MURRAY 2003, PLUMHOFF 2004) nach Inkubation von Gras mit niedrigem oder hohem Inulingehalt (60 bzw. 120 g/kg TS) in einer equinen Kotsuspension beobachtet. Auch MILNOVICH et al. (2007, 2008) belegten in Proben der Zäkumflüssigkeit zusätzlich zum signifikanten pH-Wert-Abfall unter pH 5 einen signifikanten Anstieg der Laktatkonzentration nach Inulingabe (10g/kg LM) via Nasenschlundsonde. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen RESPONDEK et al. (2007), die eine signifikante Steigerung der D- und L-Laktatkonzentration 5 Stunden nach FOS-Gabe in der Zäkumflüssigkeit ermittelten. AL JASSIM et al. (2005) beschrieben 25 Laktat-produzierende Spezies im equinen Gastrointestinaltrakt nach alimentärer Gabe von 12,5 g/ kg LM Raftilose in vivo und Probennahme 48 Stunden nach Verabreichung.

PLUMHOFF (2004) belegte nach Verabreichung von Topinamburmehl (enthält 50 % Inulin) in einem in vitro-System mit Fäzes als Inokulum eine signifikante Erhöhung der Gasproduktion sowie die Steigerung der Gesamtfettsäurenkonzentration mit steigendem Anteil an leicht verdaulichen Kohlenhydraten in der Rangfolge Grünmehl < Trockenschnitzel < Hafer < Topinambur. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen KERN et al. (1973) oder LANDES (1992) im Zäkum. LANDES (1992) und PLUMHOFF (2004) stellten weiter eine negative Korrelation zwischen dem pH-Wert und der Gesamtfettsäurenkonzentration fest. Dies ließ sich in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigen.

BERG et al. (2005) ermittelt zusätzlich einen linearen Effekt von 0g, 8g oder 24 g Fruktooligosaccharide pro Ration auf den pH-Wert und den Laktatgehalt im Kot und ebensolche Effekte auf die fäkale Propionat-, Azetat- und Butyratkonzentration. In den eigenen Untersuchungen war ein tendenzieller Anstieg der Propionat-, eine signifikante Steigerung der Butyrat- und tendenzielle Reduktion der Azetatkonzentration messbar. Dies deckte sich mit Beobachtungen früherer Studien, in denen eine konzentratreiche Fütterung die Produktion an Propionat und Butyrat steigerte und den Azetatanteil senkte. Eine Verschiebung im Azetat-Propionat-Verhältnis zugunsten des Propionats beobachteten neben PLUMHOFF (2004) bei der Inkubation von Topinambur (76:20) auch RESPONDEK et al. (2007) 5 Stunden nach Gabe von FOS in vivo sowie u.a. HINTZ et al. (1971) oder KERN et al. (1973) nach Verabreichung von leicht verdaulichen Kohlenhydraten. POULSEN et al. (2011) ermittelten in ihren in vitro Studien zum Rind nach Gabe von Inulin im Vergleich zu anderen Kohlenhydraten die geringste Azetat- und höchste Butyratproduktion. Nach Demeyer

Diskussion

et al. (1989) überwiegt in der Zäkumverdauung des Pferdes die reduktive Azetogenese, welche in einer höheren Energieausbeute resultiert als die Methanogenese. Das produzierte Azetat kann vom Wirtsorganismus weiter verstoffwechselt werden, während energiereiches Methan ungenutzt abgeatmet wird oder über den Darmkanal den Wirt verlässt. Beim azetogenen Fermentationstyp kommt es zur Steigerung der Azetatkonzentration unter Verbrauch von Wasserstoff und demnach zu einer geringeren Methanproduktion (MILLER und WOLIN 1981, BREVES und DIENER 2000). Zum besseren Verständnis sind die unterschiedlichen Fermentationstypen in Abbildung 22 dargestellt.

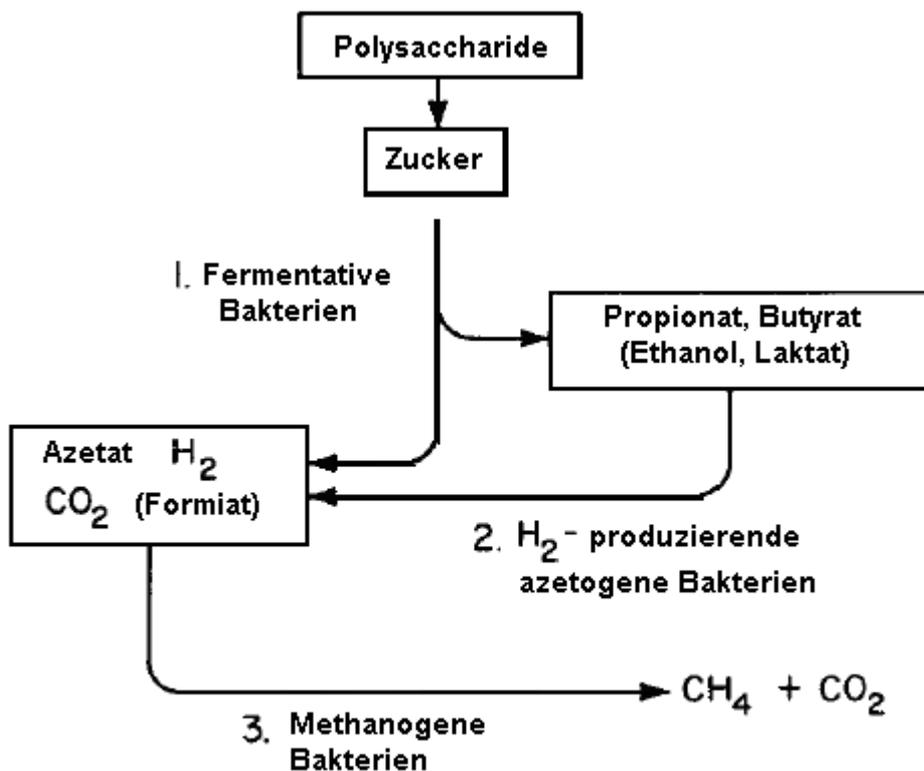


Abb. 22: Fermentationsstufen (modifiziert nach BRYANT 1979)

In der eigenen Arbeit sank die Azetatproduktion in der Adaptationsphase von Tag 1 bis auf Tag 5 unter reiner Heufütterung um die Hälfte ab (siehe Anhang Tab. A 10). Ein Einfluss des pH-Wertes wurde hierbei ausgeschlossen, da dieser während der Einstellphase konstant um $6,74 \pm 0,8$ lag. Die sinkende Azetatkonzentration deutete auf die Konkurrenz der methanogenen und azetogenen Reduktion um Wasserstoff hin. Bei der Methanogenese Cytochrom-freier Bakterien wird nur H₂ und CO₂ und/oder Formiat zu Methan umgesetzt (siehe Abb. 32). Eventuell diene das Azetat aber auch als Substrat für Cytochrom-haltige Methanbildner (JONES et al. 1987, KASTER 2010), welche Azetat, Methanol und/oder

Diskussion

Methylamin nutzen. Nach den Ergebnissen der Studie von KASTER (2010) wäre dieser Stoffwechselweg effizienter, denn in Cytochrom-freien Methanbildnern wird ca. 0,5 mol ATP/mol Methan aus H_2 und CO_2 und in Cytochrom-haltigen ca. 1 mol ATP/mol Methan gebildet. Dies würde den Anstieg der Methankonzentration während der Adaptationsphase in der vorliegenden Arbeit erklären. Jedoch müsste das Vorkommen solcher Cytochrom-freier Bakterien im equinen Zäkum noch genauer untersucht werden. Denn in einer Studie mit Isolaten vom Pferdedarm (MILLER und WOLIN 1986) gelang kein Wachstum Methanbildender Bakterien auf Azetat, Methanol, Trimethylamin und H_2 .

Nach Gabe von Raftilose sank die Azetatproduktion noch weiter ab. Vermutlich wurde hier die Azetogenese durch den niedrigen pH-Wert blockiert. Dies würde den leichten Anstieg der Konzentration dieser Säure bei steigendem pH-Wert 48 Stunden nach Konzentratgabe erklären. Eine Reduktion der Azetatkonzentration nach Konzentratgabe und in Abhängigkeit vom sinkenden pH-Wert, wurde auch in früheren Studien (WILLARD et al. 1977, HINTZ et al 1971) belegt. Nach den eigenen Untersuchungen kann also geschlossen werden, dass die Rate der Azetogenese in der equinen Dickdarmverdauung in Abhängigkeit zur Futterquelle steht. Unter reiner Heufütterung wurde in der vorliegenden Studie eine sehr geringe azetogene Fermentation gemessen. Möglicherweise nimmt die Azetogenese nicht den hohen Stellenwert bei der Fermentation im Pferdedarm ein, wie in der Literatur (DEMEYER et al. 1989, KIENZLE und ZEYNER 2007) beschrieben.

ZEYNER et al. (2005) stellten in vitro (mod. HGT nach ZEYNER 2002) nach Inkubation von Topimanbur (604 g Inulin/kg) im Vergleich zu Zellulose (995 g Zellulose/kg) neben dem signifikanten Abfall des pH-Wertes und einer signifikant höheren Produktion an kurzkettigen Fettsäuren, eine gesteigerte Gasproduktion und eine Reduktion des Ammoniakgehaltes fest. In den eigenen Untersuchungen erfolgte die signifikante Reduktion des Ammoniakgehaltes 12 Stunden nach Raftilosegabe. Dies weist auf den Verbrauch von Stickstoff für bakterielle Stoffwechselprozesse hin. Eine ähnliche Dynamik in der Ammoniakkonzentration der Fermenterflüssigkeit belegten ENGELMANN et al. (2007) in einer Langzeitstudie, in der eine langsam steigende Raftilosekonzentration (2- 16 g) über 8 Tage in vitro zugesetzt wurde. Die Konzentration der Stickstoffverbindung sank auch hier jeweils 12 Stunden ppr. sowie über den gesamten Provokationszeitraum ab. Diese Reduktion deutet auf eine gesteigerte bakterielle Synthese mit Stickstoffverbrauch während der Raftilosegabe hin. 24 Stunden nach der letzten Konzentratgabe stieg die Ammoniakkonzentration wieder an und hatte nach 48 Stunden den Ausgangswert vor Raftilosefütterung erreicht. Offenbar resultierte aus der reduzierten Raftilosegabe eine sinkende Stoffwechselaktivität der Bakterien und demzufolge

Diskussion

die Anreicherung von Ammoniak im Inokulum.

Das Gasvolumen stieg in der vorliegenden Arbeit innerhalb von 24 Stunden nach Raftiloseinkubation signifikant an. Die Beobachtung bestätigt, dass es sich bei Raftilose um ein rasch fermentierbares Kohlenhydrat handelt. Diese bekannte Eigenschaft sämtlicher Fruktane wurde bei Inulin von PLUMHOFF (2004) und ZEYNER et al. (2005) oder von LONGLAND und MURRAY (2003) bei Grasfruktan belegt. Auch VOSMER et al. (2012) beobachteten im Caesitec eine stärkere Gasproduktion nach Wechsel von einer reinen Heuration zu einer Grasmischung mit hohem Levangehalt und weiter im Vergleich zu Futtermitteln mit niedrigerem Levangehalt.

Bei der Ausdifferenzierung der Gase wurden in den eigenen Untersuchungen ein numerischer Anstieg der Wasserstoffkonzentration und eine signifikante Reduktion der Methankonzentration nach Raftilosegabe festgestellt. Möglicherweise sind wasserstoffbildende Bakterien resistenter gegenüber den pH-Wertschwankungen nach Konzentratgabe als methanogenen Spezies. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die kürzere Generationszeit von Wasserstoffbildnern im Vergleich zur methanogenen Flora. Eine lange Generationszeit methanogener Bakterien beschrieben schon BRYANT (1979) oder ZENTEK (1991).

Die geringe Aktivität der Wasserstoffbildner und überwiegende Produktion an Methan, wie sie NYARI (1992), ZENTEK (1991) und MÖSSELER (2004) für den Dickdarm, mit einer Methan-Wasserstoff-Verhältnis von 5:1 beschrieben, war in der eigenen Untersuchung nur unter reiner Heugabe (Versuchstag 1 bis 5) nachweisbar. In dieser Zeit stieg die Methanproduktion um das 10 fache an (siehe Anhang Tab. A 8). In der eigenen Studie dominierte also unter Heufütterung die methanogene Flora. Diese wurde offenbar nach Raftilosegabe kurzfristig von den Wasserstoff- und Laktat-bildenden Spezies verdrängt, was aus dem Anstieg dieser Metabolite und der Reduktion der Methankonzentration geschlossen werden kann. Die Methanproduktion stieg erst wieder 48 h nach Konzentratgabe dann aber langfristig an. Diesen Antagonismus zwischen der Produktion von Wasserstoff und Methan beschrieben schon MILLER und WOLIN (1981).

Weiter belegten diese These MOESSELER (2004) oder COENEN et al. (2006) in Studien mittels Exhalationstest. Diese beim Pferd etablierte indirekte Methode zur Messung von Gasen gastrointestinaler Keime basierte auf der Annahme, dass im Darmtrakt gebildete Gase ins Blut diffundieren und über die Lunge abgeatmet werden (NYARI, 1992). MOESSELER (2004) ermittelte nach Zulage von Inulin zur Heuration eine Steigerung der Wasserstoffproduktion. Die Methankonzentration in den Ausatemgasen stieg unter Inulingabe

Diskussion

nicht an. In der Studie von COENEN et al. (2006), bei der Topinambur (enthält 50 % Inulin) gefüttert wurde, konnte die höchste Wasserstoffkonzentration im Atemgas 5 bis 6 Stunden ppr. gemessen werden. In dieser Untersuchung wurde eine gesteigerte Laktatproduktion 2 bis 10 Stunden ppr. und die höchste Methanexhalation ca. 2,5 Stunden ppr. beobachtet. Die Ergebnisse dieser Exhalationsstudien unterstützen die These des kurzzeitigen Dominierens der Laktat- und Wasserstoffbildung über die methanogene Fermentation. Die Messzeiten waren hier wahrscheinlich zu kurz (10 h), um einen erneuten Anstieg der Methankonzentration zu erfassen. Daher kommen die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass die Gabe von Inulin oder Topinampur nur wenig Effekte auf die Methanexhalation hat.

In einem in vitro-Vergleich (Pektin, Weizen-, Maisstärke, Inulin) von POULSEN et al. (2011) wurde die höchste Wasserstoffkonzentration nach Inulinzulage ins Pansensaftinokulum gemessen. Auf die Methanproduktion hatte die Kohlenhydratquelle auch in dieser Studie keinen signifikanten Einfluss, wohl aber der pH-Wert. POULSEN et al. (2011) stellten ein pH-Wert-Optimum für die höchste Methanproduktion im Pansen von pH 6 bis 6,5 fest. GRAF (1999) dokumentierte einen idealen pH-Wert von 6,5 bis 8,1 für methanogene Bakterien in Biogasanlagen. Dies steht im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen. Hier wurde zwar nach der ersten Fütterung von Raftilose eine Reduktion der Methanproduktion bei sinkendem pH-Wert (von 6,8 auf 6,4) festgestellt (siehe Tab. 11). Jedoch war auf einem höheren pH-Wert-Niveau (über 6,5) vor der Raftilosefütterung keine geringere Methanproduktion messbar. Auch sank die Methanmenge nach der zweiten Raftilosegabe trotz sinkendem pH-Wert (6,2) nicht ab. Die Methanproduktion stand in der eigenen Studie also nicht in Abhängigkeit zum pH-Wert.

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde eine signifikante Steigerung des Gehaltes an Endotoxinen in der Fermenterflüssigkeit 24 Stunden nach Raftilosegabe gemessen. Allerdings ist das Nachweisverfahren kritisch zu betrachten (siehe Kap. 3.3.2). Es ist wahrscheinlich, dass es im Zuge der Hitzeinaktivierung innerhalb der angewendeten Methode zum Auslösen von Endotoxinen aus bis dahin intakten Bakterienzellwänden in die Untersuchungsflüssigkeit kam und demzufolge zu einem höheren Messergebnis. Im Verlauf des Experimentes wurde nach Raftilosegabe mit einer Steigerung der Anzahl gram-negativer Bakterien, welche besonders hitzesensibel reagieren, gerechnet. Die nachgewiesene Steigerung des Endotoxinwertes wurde demzufolge einerseits auf einen Zuwachs von Bakterien im Milieu (gram-negative, hitzesensible Spezies) und andererseits auf einen erhöhten Untergang säuresensibler Flora nach Milieuveränderung durch die Raftilosegabe zurückgeführt. Jedoch weisen auch andere Forschungsgruppen mit Nachweismethoden ohne Hitzeanwendung gesteigerte

Diskussion

Endotoxinwerte im Zusammenhang mit Konzentratgaben nach. So kamen LI et al. (2012) nach Steigerung des Getreideanteils in der Ration bei Rindern (Rumen: 168,32 EU/ml, Zäkum: 118,52 EU/g) oder ZEBELI et al. (2011) nach Steigerung des Stärkeanteils in der Ration zu ähnlichen Ergebnissen. Endotoxine können nach Diffusion durch das Darmepithel im Blut nachgewiesen werden. BAILEY et al. (2009) dokumentierten im Plasma von Pferden einen signifikanten Anstieg der Endotoxinkonzentration ($0,019 \pm 0,008$ EU/ml) 8 Stunden nach alimentärer Verabreichung von Oligosacchariden. Weitere Studien lassen vermuten, dass Endotoxine (MUNGALL et al. 2001), Exotoxine sowie biogene Amine (BAILEY et al. 2004) bei Erreichen des Blutkreislaufes und Transport zum Zehenendorgan das Ablösen der Huflederhaut bewirken. Somit könnten sie an der Genese von Laminitis beteidigt sein. REISINGER et al. (2002) konnten diesen Zusammenhang in einem ex vivo-Modell für Endotoxin von *Escherichia coli* und Thermolysin von *Bacillus thermoproteolyticus rokko* darstellen. Auch MUNGALL et al. (2002) beobachteten eine Thermolysin-bedingte Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen. Dabei handelt es sich um Enzyme, welche die Verbindung zwischen Dermis und Epidermis lösen können.

Zusammenfassend decken sich die eigenen Beobachtungen zu den Parametern der Stoffwechselaktivität von Bakterien größtenteils mit denen früherer in vitro- und in vivo-Untersuchungen. Eine Bolusgabe von Raftilose, als Vertreter rasch fermentierbarer Kohlenhydrate, führt auch in vitro (Caesitec) innerhalb von Stunden zu drastischen Veränderungen des Milieus. Die zäkale Azidose, die Veränderung des bakteriellen Stoffwechselprofils sowie die Bildung schädlicher Metaboliten sind im Laborexperiment Caesitec nachvollziehbar. Die Ergebnisse lassen auf einen Wechsel der dominierenden Mikroflora spekulieren. Der Nachweis dieser Speziesverschiebung mittels bakteriologischer Analysen scheint in weiteren Caesitec-Studien sinnvoll.

5.2.2 Einfluss der Korrektur zur Ausgangsration und einer wiederholten Raftilosegabe auf die Fermentation in vitro (Caesitec)

Vor der zweiten Provokationsfütterung mit Raftilose wurde über 48 Stunden die Ausgangsration an Heu in die Fermeter eingebracht.

Korrektur zur Ausgangsration (Heu 8 g)

Die Bolusgabe an Raftilose in der vorliegenden Arbeit sollte einen einmaligen übermäßigen Verzehr an Fruktanen simulieren, der nur unter bestimmten Bedingungen in Futtermitteln

Diskussion

(siehe Literaturteil: Fruktane) erreicht wird. Die Reaktionen der untersuchten Stoffwechselfparameter waren im Vergleich zur „Normaldosis“ an rasch fermentierbaren Kohlenhydraten wesentlich ausgeprägter und länger andauernd. Dennoch herrschten 48 Stunden nach der ersten Provokationsfütterung bei weiterer Heufütterung wieder annähernd Ausgangsverhältnisse im Milieu (siehe Tab. 11) der Versuchsfermenter. Die meisten gemessenen Metabolite des bakteriellen Stoffwechsels erreichten das Ausgangsniveau innerhalb von 48 Stunden nach Raftilosegabe. Nur die Konzentrationen von n-Butyrat, -Valeriat sowie Endotoxinen und Methan hatten das Ausgangsniveau noch nicht wieder erreicht. Die Wasserstoff- und n-Capronatkonzentrationen stiegen stetig bis 48 h ppr. an (siehe Tab. 14).

Solche kurzzeitigen Veränderungen im Milieu des Darminhaltes nach der Fütterung stellen physiologische Ereignisse dar. Dies belegten WILLARD et al. (1977), die im Zäkum fistulierter Pferde sowohl nach 8 kg Heufütterung (6 h ppr.) als auch nach 6 kg Konzentratgabe (7 h ppr.) einen kurzzeitigen pH-Wert-Abfall protokollierten. 6 Stunden nach Konzentratgabe war nach ihrer Beobachtung die Azetatkonzentration am signifikanten Tief- und die Propionatkonzentration am signifikanten Höhepunkt. Diese Parameter hatten nach max. 11 Stunden das Ausgangsniveau wieder erreicht. LONGLAND und MURRAY (2003) ermittelten nach in vitro-Inkubation von Inulin-haltigem Gras eine Steigerung der Laktat- und Gasproduktion bis 8 Stunden ppr. und danach die Reduktion der Konzentration an Laktat bis 20 Stunden post incubationem. In der Studie von MEDINA et al. (2002) führte eine stärkereiche Ration zu kurzzeitigen Effekten auf den pH-Wert (Reduktion bis 7 h ppr.) und die Laktatproduktion (Steigerung bis 6 h ppr.) im Zäkuminhalt fistulierter Pferde. Danach kam es zu einer Angleichung an die Ausgangsverhältnisse. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch RESPONDEK et al. (2007) nach Gabe von FOS an Zäkum-fistulierte Pferde. Hier stiegen die D-Laktat- und L-Laktatkonzentrationen bis 5 Stunden ppr. an und fielen dann unter den Ausgangswert ab.

Zusammenfassend bleibt zu schlussfolgern, dass es sich bei den meisten in der eigenen Studie dokumentierten Veränderungen um mittelfristige Effekte (max. 2 Tage) auf die Mikroflora des Zäkums unter in vitro-Bedingungen handelte. Diese Veränderungen waren wahrscheinlich ohne Langzeitfolgen für das Milieu und konnten durch nachfolgende Heufütterung wieder korrigiert werden. Es ist anzunehmen, dass auch die Konzentrationen an Methan, Wasserstoff sowie einiger kurzkettiger Fettsäuren nach weiterer Heufütterung (über 48 h hinaus) zu den

Diskussion

Ausgangswerten zurückkehren. Bezüglich der Übertragbarkeit auf die physiologischen Verhältnisse im Pferdedickdarm bleibt zu bedenken, dass hier weitere Faktoren, wie Diffusion, aktiver Transport und Individualität der Mikroflora von Pferd zu Pferd zu berücksichtigen sind. Die toxischen Effekte der Metabolite auf die Darmwand oder nach Diffusion auf den gesamten Organismus inklusive Hufapparat bedürfen weiterer wissenschaftlicher Studien.

Wiederholte Raftilosegabe

In der Vorüberlegung zu dieser Studie wurde spekuliert, dass eine wiederholte Gabe des Konzentrates zu einem weniger starken Untergang an Bakterien, demzufolge zu einer geringeren Endotoxinausschüttung führt. Und ein weniger starkes Bakterienwachstum mit geringem Ammoniakverbrauch also geringerer Reduktion der Ammoniakkonzentration in der Fermenterflüssigkeit belegt werden kann. Nach dieser These müssten größere Mengen an Fermentationsprodukten gebildet werden, da durch die erste Raftilosegabe schon mehr säuretolerante Bakterien im Milieu vorhanden wären. Eine Proliferation der Laktat verbrauchenden Bakterien nach der ersten Raftilosegabe würde in einem geringeren Anstieg von Laktat bei der zweiten Provokationsfütterung resultieren.

Nach einer zweiten Provokationsfütterung mit Raftilose an Versuchstag 7 wurden ähnlichen Veränderungen im Metabolitgehalt des Inkubationsmediums gemessen, wie nach der ersten Fütterung. Diese Veränderungen waren größtenteils wesentlich abrupter und stärker (pH, FFS, NH₃, Endotoxine) ausgeprägt und unterschieden sich diesbezüglich signifikant von denen nach der ersten Raftilosegabe (siehe Kap. 4; Tab. 11). Demzufolge kam es in der Fermenterflüssigkeit, anders als erwartet, sowohl zu einem stärkeren Bakterienuntergang (pH-Wertreduktion, Endotoxinanstieg) als auch zu einer stärkeren Proliferation säuretoleranter Spezies (NH₃-Abfall) als bei der ersten Raftilosegabe. Möglicherweise weil sich in der Inkubationsflüssigkeit nun eine höhere Dichte an koloniebildenden Einheiten befand als vor der ersten Provokation.

Da die Steigerung der Gesamt- und L-Laktatkonzentrationen im Vergleich zur ersten Provokation deutlich geringer war (v.a. Versuch 2, siehe Anhang Tab. A3 und 4), wurde geschlussfolgert, dass sich entweder weniger Laktatbildner im Milieu befanden oder mehr Laktat-verbrauchende Bakterien gebildet wurden waren. Diese Vermutung steht allerdings im Gegensatz zu den Beobachtungen von DE FOMBELLE et al. (2003), die nach stärkereicher Fütterung signifikant weniger Laktat-verbrauchende Bakterien im Zäkum nachwiesen als im Anschluss an eine raufutterreiche Fütterung. Die Anzahl an Streptokokken und Laktobazillen

Diskussion

unterschied sich in dieser Studie zwischen den beiden Rationen nicht. In Bezug auf die eigene Arbeit ließen die Aussagen von DE FOMBELLE et al. (2003) also folgende Rückschlüsse zu: Die Laktat-bildenden Bakterien im Milieu wurden wahrscheinlich nach der ersten Provokationsfütterung aufgrund einer Konkurrenz um Nährstoffe und Stickstoff von methanogenen Spezies zurückgedrängt. Diese These kann durch die Beobachtung gestützt werden, dass es nach der zweiten Provokationsfütterung zu einem weiteren Anstieg der Methanproduktion aber nicht zu einem Konzentrationsanstieg an Wasserstoff kam, so wie nach der ersten Raftlosegabe. Dies deutete auf einen Verbrauch an Wasserstoff hin, wie er zur Energiegewinnung bei Methanbildnern beschrieben wurde (BRYANT 1979). Es ist aber auch denkbar, dass die große Menge an Wasserstoff, die nach der ersten Raftlosegabe beobachtet wurde, zu einer Hemmung der Wasserstoffbildung führte oder dass den Wasserstoff-produzierenden Bakterien schlichtweg das Substrat (Laktat) fehlte.

Zusammenfassend wurde in Bezug auf die Methan- und Wasserstoffbildung auf eine Adaptation der Flora an die konzentratreiche Fütterung geschlossen. Trotz starker Milieuveränderungen wurde das Wachstum der methanogenen Bakterien nach der zweiten Raftlosegabe wenig beeinflusst. Dies beobachtete auch MÖSSELER (2004), die nach 10-tägiger Topinamburfütterung deutlich weniger Wasserstoff im Exhalat an Tag 10 als an Tag 1 nachwies. Trotz Adaptation war es in der eigenen Studie auch nach der zweiten Raftlosegabe zu einem starken Bakterienuntergang gekommen. Dies ließ sich aus dem erneuten starken Anstieg des pH-Wertes oder auch der Endotoxinkonzentration schließen (Diskussion siehe Kap. 5.2.1). Welche Populationen abstarben und wie genau die Speziesverschiebungen nach den beiden Provokationsfütterungen aussahen, können nur bakteriologische Nachweise aufklären. Diese Untersuchungen sind für weitere Caesitec-Studien empfehlenswert.

5.2.3 Vergleich der Caesitec-Ergebnisse mit HGT-Studie

Zu Beginn dieses Teils der Arbeit folgt ein kurzer Vergleich zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen Inokula in der HGT-Studie.

In der HGT-Studie wurden die Substratvarianten jeweils mit einem Inokulum aus der flüssigen und einem aus der festen Zäkumphase inkubiert. Dabei wurden signifikante Unterschiede in der Produktion der Stoffwechsellparameter und der Gasbildung festgestellt. In der Flüssigvariante waren ein niedrigerer pH-Wert und eine höhere Konzentrationen aller Stoffwechselprodukte, ein größeres Gasvolumen und eine höhere Methanproduktion messbar.

Diskussion

Dies ließ auf eine höhere Stoffwechselrate in der Variante mit flüssigem Zäkuminhalt schließen. Allerdings wurden vor Inkubationsstart keine Messungen der Metabolitenkonzentrationen im Inokulum durchgeführt. Sämtliche Messungen nach Inkubationsende stellen theoretisch also die Summe der während der HGT-Inkubation produzierten und schon vorher in der flüssigen Zäkumphase gelösten Metabolite der bakteriellen Flora dar. In weiteren HGT-Studien ist vor der Inkubation eine Untersuchung des Inkubationsmediums bezüglich des Metabolitenprofils zu ergänzen, um eine Fehlinterpretation auszuschließen. Die in der eigenen Arbeit parallel inkubierten Blindwerte der Inokula sind in dieser Fragestellung nicht hilfreich. Denn auch hier erfolgte während der HGT-Inkubationszeit eine Fermentation je nach Inokulum mit mehr (Festphase) oder weniger (Flüssigphase) Substrat. Einen Anhaltspunkt für die Metabolitenkonzentration zum Zeitpunkt 0 oder wieviel Substrat in den unterschiedlichen Phasen des Zäkuminhaltes enthalten ist und ob mehr fermentationsfähige Bakterien in der Fest- oder Flüssigphase vorlagen, liefern diese Daten daher nicht. Nach den Beobachtungen der Inokulumblindfermenter der vorliegenden Studie produzieren die Bakterien in der flüssigen Zäkumvariante mehr Methan und kurzkettige Fettsäuren als in der Variante mit festem Inokulum.

In der Inokulumvariante mit zäkaler Festphase differierten (siehe Kap. 4; Tab. 13) die Konzentrationen der bakteriellen Metaboliten zwischen den beiden Substratvarianten stärker. Für einen Vergleich von Futtermitteln wäre demnach die Variante mit Zäkumfestphase besser geeignet, obwohl die höheren Konzentrationen an Metaboliten in der flüssigen Inokulumvariante gemessen wurden.

Im Ansatz mit flüssiger Zäkumphase wurde den eigenen HGT-Untersuchungen nach nur eine geringe Produktion von Wasserstoff gemessen, sowohl bei der Inkubation mit Heu als auch bei der Substratkombination. Die größte Menge dieses Gases wurde in den Festphasenvarianten erfasst, wobei hier die Substratkombination die größte Produktion aufwies. Daher wurde geschlussfolgert, dass die Wasserstoff-produzierenden Bakterien strukturassoziiert vorlagen. Es wurden jedoch große individuelle Schwankungen in der Gaszusammensetzung (siehe Anhang Tab. A 41) zwischen den einzelnen Wiederholungen beobachtet. Eine Strukturaneftung von Wasserstoff-produzierenden Bakterien, deren Substrat organische Substanz ist, belegen auch frühere Studien. Hier wurden anhand von Aktivitätsmessungen der Polysaccharidasen im Pansen von Rind und Schaf (MARTIN et al. 1993, EUGÉNE et al. 2004) geschlussfolgert, dass die am Zellwandabbau beteiligten methanogenen Bakterien strukturassoziiert vorliegen. JOUANY et al. (2009) belegten zusätzlich in festem Darminhalt eine höhere Amylaseaktivität der Bakterien des Zäkum und

Diskussion

Kolon vom Pferd.

Eine höhere Methanproduktion wurde in der eigenen Studie bei der Inkubation der Flüssigvariante erfasst. Methanogene Bakterien sind auf Wasserstoff, Kohlendioxid und niedermolekulare Stoffe aus dem Abbau organischer Substanz angewiesen, welche im Darm frei oder gelöst vorliegen. Eine Anheftung an Fasern ist demnach unnötig. Dies deckt sich mit den Aussagen von SCHULZ et al. (1982). Sie beschrieben einen notwendigen Wassergehalt von mindestens 50 % für Methanbakterien. Aus den eigenen Beobachtungen und der Literaturstudie heraus wurde geschlussfolgert, dass Methanbildner nicht strukturassoziiert vorliegen.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Caesitec-Studie und der HGT-Untersuchungen kommt man zu folgenden Aussagen.

In der HGT-Studie mit einer Endzeit von ca. 24 Stunden ließen sich betreffend der Gaskonzentration Parallelen zu den Ergebnissen der Caesitec-Methode (24 h ppr.) feststellen. Bei der Kombination mit Raftilose ergaben sich im Vergleich zur Inkubation von Heu allein in der Zäkumfestphasenvariante tendenziell höhere Wasserstoff- und niedrigere Methankonzentrationen. Dies wurde auch im Caesitec beobachtet. In der Variante mit flüssigem Zäkuminhalt wurden zwischen Heu und der Substratkombination keine Unterschiede bezüglich der Wasserstoffproduktion gemessen. Jedoch wurden auch in dieser Inokulumvariante bei der Inkubation von Heu mit Raftilose niedrigere Konzentrationen an Methan erfasst als bei Heu allein (siehe Anhang Tab. 45), was die Ergebnisse der Caesitec-Studie widerspiegelte. Zu welchem Zeitpunkt welches Gas vermehrt produziert wurde, lässt sich im HGT aufgrund der Versuchsanordnung nicht nachvollziehen. Im Intervall von 3 bis 6 Stunden (siehe Anhang Tab. 44) wurde bei beiden Inokulumvarianten die größte Gasproduktion gemessen. Da die Steigerung der Methanproduktion jedoch deutlich später beginnt (siehe Caesitec, Anhang Tab. 14), können die Ergebnisse der HGT-Methode möglicherweise zu Fehlinterpretationen führen.

Vergleicht man die Ergebnisse der Stoffwechselprodukte der Inkubationsflüssigkeit, so stellt man fest, dass mehr signifikante Unterschiede zwischen den Substraten (Heu oder Heu+Raftilose) in der Caesitec-Methode als in der HGT-Studie vorlagen. In der HGT-Untersuchung wurden bei Inkubation mit Zäkumfestphase und der Kombination von Raftilose mit Heu tendenziell höhere Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren, Gesamt-, D-, und L-Laktat, eine niedrigere Ammoniakkonzentration sowie ein niedriger pH-Wert gemessen als

Diskussion

bei Inkubation mit Heu allein. Doch diese Ergebnisse waren nur in wenigen Fällen statistisch zu sichern. In der Flüssigvariante des Inokulums waren bei der benannten Substratkombination geringere Konzentrationen an Gesamtfettsäuren, Azetat, i-, n-Butyrat, n-Valeriat, n-Capronat, D-Laktat aber ein niedrigerer pH-Wert messbar. Hierbei wurden tendenziell höhere Konzentrationen an Ammoniak, Gesamt- und L-Laktat festgestellt. Diese Ergebnisse standen teilweise im Gegensatz zu den Beobachtungen der Caesitec-Studie (siehe Kap. 4; Tab. 12 II und 13 II). Auch waren sie bis auf den pH-Wert und die Gesamtkonzentration an FFS pro 100 mg Substrat statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Caesitec-Methode der HGT-Studie vorzuziehen ist, da hier nach 24-stündiger Inkubation mehr signifikante Unterschiede zwischen den beiden Substratvarianten messbar waren. Weitere Vorteile ergeben sich aus dem Versuchsaufbau. In der HGT-Studie beschränken sich dynamische Messungen auf das Gasvolumen. Eine Entnahme von Inkubationsflüssigkeit oder Gasen im laufenden Experiment zur Kontrolle der Konzentrationen der Stoffwechselfparameter ist in dieser Versuchsanordnung nicht möglich. Bei der Caesitec-Methode sind Probennahmen aus der Inkubationsflüssigkeit und den Gasbehältern während der Inkubation möglich. Zusätzlich besteht im Caesitec die Möglichkeit der längeren Versuchsdauer. Dieser semikontinuierliche Charakter stellt einen klaren Vorteil der Caesitec-Methode gegenüber dem HGT dar. Für weitere in vitro-Untersuchungen zu Fermentationsdynamik und Florabeschaffenheit im equinen Zäkum empfiehlt sich nach den eigenen Beobachtungen die Verwendung der Caesitec-Methode.

5.3 Schlussbetrachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie decken sich größtenteils mit den Beobachtungen früherer in vitro und in vivo-Untersuchungen zu den Parametern der Stoffwechselaktivität von Bakterien im equinen Zäkum nach Gabe von rasch fermentierbaren Kohlenhydraten. Die Bolusgabe von Raftilose führte in den eigenen Untersuchungen innerhalb von Stunden zu einer Azidierung (Konzentrationsanstieg von Fettsäuren, Laktat) der Fermenterflüssigkeit und einer vermehrten Produktion von Wasserstoff, einem Verbrauch von Ammoniak sowie der Steigerung der Endotoxinkonzentration. Diese drastischen Veränderungen des Milieus ließen auf einen Wechsel der dominierenden Mikroflora mit Untergang säuresensibler und Vermehrung säuretoleranter Spezies schließen. Die nach eigenen Beobachtungen unter

Diskussion

Heufütterung dominierende methanogene Fermentation wurde nach Raftilosegabe durch azetogene und Wasserstoff-liefernde Fermentationsprozesse verdrängt. Da die meisten Metabolitenkonzentrationen bis 48 Stunden nach Konzentratgabe unter reiner Heufütterung wieder zu den Ausgangswerten zurückgekehrt waren, wurde geschlussfolgert, dass diese Veränderungen wahrscheinlich ohne Langzeitfolgen für das Milieu waren. Nach einer zweiten Raftilosegabe wurde das drastische Wachstum der methanogenen Bakterien trotz erneuter starker Milieuveränderungen (Azidierung, Laktat- Fettsäurenproduktion, Ammoniakreduktion) nur wenig beeinflusst. Bei dieser Wiederholungsgabe von Raftilose wurde keine erneute Steigerung der Wasserstoffproduktion beobachtet. Es war demnach anzunehmen, dass die methanogenen Spezies aufgrund ihrer längeren Generationszeiten bei der ersten Raftilosegabe unterlegen waren und erst nach der zweiten Konzentratgabe das Milieu dominierten. Wie genau die Speziesverschiebungen nach den beiden Provokationsfütterungen aussahen, können nur bakteriologische Nachweise aufklären. Diese Untersuchungen sind für weitere Caesitec-Studien empfehlenswert. Im generellen Vergleich von in vitro Verfahren mit den physiologischen Verhältnisse im Pferdedickdarm müssen weitere Faktoren, wie Diffusion, aktiver Transport, wirtsspezifische Individualität der Mikroflora sowie deren Einflüsse auf die Mukusdicke und Epithelzellen der Darmschleimhaut berücksichtigt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte HGT-Studie lieferte in Bezug auf die Faseradaptation von Bakterien interessante Ergebnisse. Nach den eigenen Untersuchungen lagen Wasserstoff-produzierende Spezies strukturassoziiert vor, wohingegen die Methan-produzierende Flora in der flüssigen Zäkumphase anzutreffen war. Im Vergleich der beiden in vitro-Methoden stellte sich der semikontinuierliche Charakter der Caesitec-Studie als klarer Vorteil gegenüber dem HGT dar. Zudem lieferte der Caesitec in der statistischen Auswertung mehr signifikante Unterschiede zwischen den Substratvarianten. Für weitere in vitro-Untersuchungen zur Fermentationsdynamik und Florabeschaffenheit im equinen Zäkum empfiehlt sich daher die Verwendung der Caesitec-Methode.

Zusammenfassung

VI. Zusammenfassung

Einleitung: Zur Untersuchung alimentär bedingter Hufrehe wurden in zahlreichen Fütterungsstudien Dysbiosen durch hohe Gaben von Fruktanen, den Speicherkohlenhydraten der Gräser, ausgelöst. Als Modellfruktan diente dabei unter anderem Raftilose.

Ziele der Untersuchungen: In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob unter Verwendung des in vitro-Systems „Caesitec“ (Caecum Simulation Technique) der Einfluss von Raftilose auf die Fermentation und Mikroflora des equinen Zäkums nachvollzogen werden kann. Besonderes Interesse galt den Kurzzeit-Effekten nach einer Einmalgabe des Zucker-Konzentrates. Die mittels der Caesitec-Methode gewonnenen Aussagen wurden mit den Ergebnissen einer HGT-Studie (Hohenheimer Gasbildungstest) verglichen. Ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit waren die Veränderungen bei wiederholter Provokationsfütterung im Caesitec.

Materialien und Methoden: Die Untersuchungen umfassten 3 Caesitec-Durchläufe mit insgesamt 11 Versuchsfermentern (8 Probenfermenter, 3 Blindfermenter) und einer Versuchsdauer von jeweils 9 Tagen. Als Inokulum diente direkt nach Schlachtung gewonnener Zäkuminhalt von Pferden. Nach einer Adaptationsphase von 5 Tagen, in der 8g Heu pro Fermenter gefüttert wurden, folgte jeweils nach Probennahme zusätzlich zur täglichen Heuration an den Versuchstagen 5 und 7 eine Provokationsgabe von 16g Raftilose. Jeweils parallel zum Start eines Caesitec-Versuches wurde eine 18-stündige HGT-Studie durchgeführt. Dabei wurden als Inokulum Proben aus der flüssigen sowie der festen Zäkumphase des gleichen Spendertieres mit Heu (3 Kolben) bzw. einer Heu-Raftilose-Mischung (3 Kolben) inkubiert. Ausserdem wurden Blindwertmessungen für die Inokula (je 2 Kolben) und die Substrate (je 2 Kolben) durchgeführt. Zur Beurteilung der bakteriellen Aktivität in der Fermenter- bzw. Kolbenflüssigkeit wurden der pH-Wert, spezielle Stoffwechselfparameter (Laktat, flüchtige Fettsäuren, Ammoniak, Endotoxine) sowie die produzierte Gasmenge und die Methan- und Wasserstoffkonzentrationen im Gasmisch bestimmt.

Ergebnisse: Eine Bolusgabe von Raftilose führte im Caesitec-System innerhalb von Stunden zu einer Azidierung der Fermenterflüssigkeit mit signifikantem Konzentrationsanstieg von Fettsäuren und Laktat, einer Reduktion von Ammoniak ($p < 0,05$), der Steigerung der Endotoxinkonzentration ($p < 0,05$) sowie der vermehrten Produktion von Fermentationsgasen ($p < 0,01$), insbesondere von Wasserstoff (siehe Tabelle, Versuchstag 5 vs. Versuchstag 6). Nach der zweiten Raftilosegabe wurde im Caesitec ein paralleler Anstieg der Laktat-, Fettsäuren- und Methankonzentrationen beobachtet, eine erneute Steigerung der

Zusammenfassung

Wasserstoffproduktion blieb jedoch aus (siehe Tabelle, Versuchstag 7 vs. Versuchstag 8). Die Ergebnisse der Caesitec-Studie wurden durch die Messungen in der HGT-Untersuchung weitestgehend bestätigt. Während der HGT-Studie waren die stärkste Wasserstoffproduktion in der festen Inokulumvariante und die stärkste Methanproduktion in der flüssigen Inokulumvariante messbar.

Schlussfolgerungen: Die drastischen Veränderungen des Milieus lassen auf einen Wechsel des Mikrofloraprofils mit Untergang säuresensibler und Proliferation säuretoleranter Spezies (Ammoniakverbrauch, Endotoxinanstieg) schließen. Diese im Caesitec gewonnenen Ergebnisse spiegeln die Beobachtungen früherer in vivo-Studien wider. Aus den Beobachtungen wird geschlussfolgert, dass im Fermenter unter reiner Heufütterung die methanogenen Spezies die equine Zäkumflora dominieren. Nach der Konzentratgabe wurde ein Wechsel von der methanogenen Fermentation zu Wasserstoff- und Fettsäurenproduzierenden Stoffwechselwegen beobachtet. Dies resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem Überangebot an Nährstoffen für Spezies mit kurzen Generationsintervallen. Es ist anzunehmen, daß die methanogene Flora aufgrund ihres längeren Generationszyklus zeitweise unterlegen war. Aus den Ergebnissen der HGT- Analysen wird weiterhin geschlossen, dass Wasserstoff-produzierende Spezies strukturassoziiert vorliegen, wohingegen Methan-produzierende Bakterien in der flüssigen Zäkumphase anzutreffen sind. Im Vergleich der beiden in vitro-Systeme liefert die Caesitec- Methode deutlich signifikante Unterschiede zwischen den Substratvarianten und zeigt sich auch aufgrund der langen Versuchsdauer mit Möglichkeit der Probennahme innerhalb des laufenden Versuchs der HGT-Studie überlegen.

Mittelwert und Signifikanzen der wichtigsten Ergebnisse der Caesitec-Studie

Parameter	Versuchstag				
	5	6	7	8	9
pH	6,82 d	6,37 b	6,83 d	6,22 a	6,58 c
Gasvolumen [ml]	521 abc	2760 d	542 bc	2856 d	493 abc
H ₂ [µmol/l]	39,59 a	943,78 ab	1645,51 b	683,13 ab	355,37 a
CH ₄ [µmol/l]	3477,85 c	1260,07 ab	2115,23 abc	2282,65 abc	2612,90 bc
Freie Fettsäuren [mmol/l]	23,745 a	37,972 bcd	29,822 ab	44,276 d	25,899 a
Laktat [mmol/l]	0,029 a	18,030 b	0,080 a	14,975 c	0,626 a
NH ₃ [mmol/l]	17,84 e	12,21 b	16,03 d	9,03 a	14,05 c
Endotoxin [EU/ml]	13,076 a	108,531 bc	63,864 abc	127,502 c	58,005 ab

Tage der Konzentratgabe

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte (p < 0,05) innerhalb einer Zeile
(beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Summary

VII. Summary

Initiation: To examine pasture-associated laminitis numerous feeding studies use high oral doses of inulin-type fructans to trigger dysbiosis *in vivo*. Raftilose is a commercially available form of fructan carbohydrate that suits as a model substance.

Questions: The aim of this study was to investigate the influence of Raftilose on the fermentation and microbiotics of the cecum using the *in vitro*-system “Caesitec” (Caecum Simulation Technique). Particular focus was put on short-time effects after single administration of concentrated raftilose. Moreover the results of the Caesitec-study were compared to those from a HGT (Hohenheimer Gas Test). In addition the effects of a repeated application of Raftilose were investigated with the Caesitec-system.

Material and Methods: Overall 3 Caesitec repetitions with a total of 11 fermenters (8 testfermenter, 3 blindfermenter) were performed with a single test duration of 9 days. Cecal samples from slaughtered horses were used as inoculum. A preconditioning period of 5 days with a daily sampling and thereafter administration of 8 g of hay per fermenter was followed by a provocation period where in addition 16g Raftilose were applied as a bolus at day 5 and 7. In parallel to the Caesitec a HGT was conducted over 18 hours. Samples from the solid and liquid cecal phase of the same donor were used as inoculum and were incubated with either hay (3 flasks) or hay/Raftilose (3 flasks). Besides blank values for inocula and substrates (2 flasks each) were measured. To evaluate microbial activity in the fermenter fluid pH value, certain metabolic parameters (lactate, volatile fatty acids, ammonia, endotoxins) as well as the gas volume and the concentration of methane and hydrogen were determined.

Results: Using the Caesitec-system the provocation by high amounts of Raftilose results within hours in an acidification of fermenter fluid including significant rise of lactate and volatile fatty acids, a decrease of ammonia ($p < 0,05$), an increase of endotoxine ($p < 0,05$) and a higher production of gases ($p < 0,01$) especially hydrogen (see table, day 5 vs. day 6). After the second Raftilose treatment a rise of lactate, volatile fatty acids and methane was measured, but no repeated rise of hydrogen production took place (see table, day 7 vs. day 8). The results of the Caesitec-study were largely confirmed by the measurements of the HGT-investigation. During the HGT-study the highest production of hydrogen was measured in the solid variant and the highest amount of methane was detected in the liquid variant of inocula.

Conclusion: This profound change of the milieu suggests a modification of the microflora composition with the destruction of acid sensitive and proliferation of acid tolerant species (ammonia consumption, increase of endotoxins). These results of the Caesitec reflect observations of earlier *in vivo*-studies.

Summary

Thus it can be assumed, that during fermentation under hay feeding conditions methanogen species are dominant in the equine cecal fluid. After administration of concentrated rafterilose a change from methanogenic fermentation to hydrogen and fatty acid producing metabolism was observed. This result very likely reflects the excess supply of nutrients for bacterial species with short generation intervals. It can be assumed that the slowly reproducing methanogenic flora was at least temporary outnumbered.

Furthermore, the analyses of the HGT reveal that hydrogen producing species likely exist associated to particles whereas methanogenic bacteria are prevalent in the liquid phase of cecal content.

Comparing both in vitro-systems the Caesitec-method not only produced notably significant differences in between the various substrates but also appeared to be beneficial due to the longer duration of the test that allows sampling within the ongoing experiment.

Mean and significance of important results of caesitec-method

parameter	day				
	5	6	7	8	9
pH	6,82 d	6,37 b	6,83 d	6,22 a	6,58 c
Gasvolume [ml]	521 abc	2760 d	542 bc	2856 d	493 abc
H ₂ [μmol/l]	39,59 a	943,78 ab	1645,51 b	683,13 ab	355,37 a
CH ₄ [μmol/l]	3477,85 c	1260,07 ab	2115,23 abc	2282,65 abc	2612,90 bc
Volatile fatty acid [mmol/l]	23,745 a	37,972 bcd	29,822 ab	44,276 d	25,899 a
lactat [mmol/l]	0,029 a	18,030 b	0,080 a	14,975 c	0,626 a
NH ₃ [mmol/l]	17,84 e	12,21 b	16,03 d	9,03 a	14,05 c
endotoxin [EU/ml]	13,076 a	108,531 bc	63,864 abc	127,502 c	58,005 ab

days of provocation

ab different letters marks significant effects ($p < 0,05$) within a row (started with the lowest Value)

8 LITERATURVERZEICHNIS

Al Jassim RA, Scott PT, Trebbin AL, Trott D, Pollitt CC. The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Jul 1;248(1):75-81.

Albrecht G, Biemelt S, Baumgartner S. Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances. *New Phytologist.* 1997;136(1):137-44.

Albrecht G, Kammerer S, Praznik W, Wiedenroth EM. Fructan content of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) under hypoxia and following re-aeration. *New Phytologist.* 1993;123(3):471-6.

Albrecht G, Mustruph A, Fox TC. Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots. *Physiologia Plantarum.* 2004;120(1):93-105.

Applegate CS, Hershberger TV. Evaluation of in vitro and in vivo Cecal Fermentation Techniques for Estimating the Nutritive Value of Forages for Equine. *J Anim Sci.* 1969 January 1, 1969;28(1):18-22.

Arrieta J, Hernández L, Coego A, Suarez V, Bamori E, Mene´ndez C, Petit-Glatron MF, Chambert R, Selman-Housein G. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* 1996;142:1077-85.

Asplin KE SM, Pollitt CC, McGowan CM. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *The Veterinary Journal.* 2007;174:530-5.

Bacon JS, Loxley R. Seasonal changes in the carbohydrates of the Jerusalem Artichoke tuber. *Biochem J.* 1952 May;51(2):208-13.

Literaturverzeichnis

Bailey SR, Adair HS, Reinemeyer CR, Morgan SJ, Brooks AC, Longhofer SL, Elliott J. Plasma concentrations of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose-induced laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009;129:167-73.

Bailey SR, Baillon ML, Rycroft AN, Harris PA, Elliott J. Identification of equine cecal bacteria producing amines in an in vitro model of carbohydrate overload. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Apr;69(4):2087-93.

Bailey SR, Marr CM, Elliott J. Identification and quantification of amines in the equine caecum. *Res Vet Sci*. 2003 Apr;74(2):113-8.

Bailey SR, Marr CM, Elliott J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *Vet J* 2004;167:129-42.

Bailey SR, Menzies-Gow NJ, Harris PA, Habershon-Butcher JL, Crawford C, Berhane Y, Boston RC, Elliott J. Effect of dietary fructans and dexamethasone administration on the insulin response of ponies predisposed to laminitis. *JAVMA*. 2007;231(9):1365-73.

Bailey SR, Rycroft A, Elliott J. Production of amines in equine cecal contents in an in vitro model of carbohydrate overload. *J Anim Sci*. 2002 October 1, 2002;80(10):2656-62.

Bailey SR, Wheeler-Jones C, Elliott J. Uptake of 5-hydroxytryptamine by equine digital vein endothelial cells: inhibition by amines found in the equine caecum. *Equine Vet J*. 2003 Mar;35(2):164-9.

Bancal P, Carpita NC, Gaudillere JP. Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. *New Phytologist*. 1992;120(3):313-21.

Bang F. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1956;98(5):325-51.

Baruc CJ, Dawson K, Baker JP. The characterisation and nitrogen metabolism of equine caecal bacteria. 8th ENPS. 1983:151-6.

Literaturverzeichnis

Bender A, Breves G, Stein J, Leonhard-Marek S, Schroder B, Winckler C. Colonic fermentation as affected by antibiotics and acidic pH: Application of an in vitro model. *Z Gastroenterol.* 2001 Nov;39(11):911-8.

Bertók L. Effect of bile Acids on endotoxin in vitro and in vivo (phsico-chemical defense): bile deficiency and Endotoxin Translocation. *Ann NY Acad Sci.* 1998;851(408-10):DOI:10.1111/j.749-6632.1998.tb09016.

Beuvink JMW, Spoelstra SF, Hogendorp R. An automated system for measuring the time course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. *Neth J Agric Sci* 1992;40:401-7.

Bezzate S, Steinmetz M, Aymerich S. Cloning, sequencing, and disruption of a levanase gene of *Bacillus polymyxa* CF43. *J Bacteriol.* 1994;176:2177-83. .

Bieleski RL. Fructan Hydrolysis Drives Petal Expansion in the Ephemeral Daylily Flower. *Plant Physiol.* 1993 Sep;103(1):213-9.

Blümmel M, Becker K. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by in vitro gas production and their relationship to voluntary feed intake. *Br J Nutr.* 1997 May;77(5):757-68.

Bohmer BM, Branner GR, Roth-Maier DA. Precaecal and faecal digestibility of inulin (DP 10-12) or an inulin/*Enterococcus faecium* mix and effects on nutrient digestibility and microbial gut flora. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2005 Dec;89(11-12):388-96.

Bonhomme A. Attachment of horse cecal bacteria to forage cell walls. *J Vet Sci.* 1986;48:313-22.

Bonhomme-Florentin A. Essais de culture in vitro des cyclosposthiidae, ciliés endocommensaux de l'intestin du cheval. Rôle des ciliés dans la dégradation de la cellulose. *Protistologica*, V. 1969;4:519-22, zit. nach Julliand (1992)

Bonhomme-Florentin A. Degradation of hemicellulose and pectin by horse caecum contents. *Br J Nutr.* 1988 Jul;60(1):185-92.

Literaturverzeichnis

Bonnett GD, Sims IM, Simpson RJ, Cairns AJ. Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytologist*. 1997;136(1):11-7.

Boone DR, Whitman WB, Rouvière P. Diversity and taxonomy of methanogens. *Methanogenesis* J G Ferry New York & London, Chapman & Hall: 35-80. 1993.

Bothe C. Effekte unterschiedlicher Stärketräger und deren Bearbeitung auf die postprandiale Glukose- und Insulinreaktion beim Pferd. 2001;Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation med.vet.

Bowden D, Taylor DK, Davis WEP. Water-soluble carbohydrates in orchardgrass and mixed forages. *Can J Plant Sci*. 1968;48:9.

Branner GR, Bohmer BM, Erhardt W, Henke J, Roth-Maier DA. Investigation on the precaecal and faecal digestibility of lactulose and inulin and their influence on nutrient digestibility and microbial characteristics. *Arch Anim Nutr*. 2004 Oct;58(5):353-66.

Breves G, Diener M. Funktionen des Dickdarmes. VON ENGELHARDT u BREVES (Hrsg): *Physiologie der Haustiere* Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart. 2000:394-6.

Brøkner C, Austbø D, Næsset JA, Knudsen KE, Tauson AH. Equine per-caecal and total tract digestibility of individual carbohydrate fractions and their effect on caecal pH response. *Arch Anim Nutr*. 2012 Dec; 66(6):490-506

Bryant MB. Microbial methane production - theoretical aspects. *J Anim Sci*. 1979;48:193-201.

Carlsson J. A levansucrase from *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 1970;4:97-113.

Chatterton NJ, Harrison PA, Bennett JH, Asay KH. Carbohydrate partitioning in 185 accessions of gramineae grown under warm and cool temperatures. *J Plant Physiol*. 1989;143:169-79.

Cone JW, Van Gelder AH, Visscher GJW, Oudshoorn L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim Feed Sci Technol*. 1996;61:113-28.

Literaturverzeichnis

Costa MC, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Stämpfli HR, Kim PT, Sturgeon A, Weese JS. Comparison of the Fecal Microbiota of Healthy Horses and Horses with Colitis by High Throughput Sequencing of the V3-V5 Region of the 16S rRNA Gene. PLoS ONE. 2012;7(7):e41484, doi:10.1371/journal.pone.0041484.

Crawford C, Sepulveda MF, Elliott J, Harris PA, Bailey SR. Dietary fructan carbohydrate increases amine production in the equine large intestine: Implications for pasture-associated laminitis. J Anim Sci. 2007 Jun 25;85:2949-58.

Czech C. Die digitale Phlebographie des an Hufrehe erkrankten Pferdes. [Dissertation med. Vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2006.

Czerkawski JW, Breckenridge G. The fermentation of sugar-beet pulp and sucrose in an artificial rumen, and the effect of linseed oil fatty acids on the fermentation. Br J Nutr. 1969 Mar;23(1):51-66.

Czerkawski JW, Breckenridge G. Small scale apparatus for studying rumen fermentation in vitro. Lab Pract. 1970 Jul;19(7):717-9 passim.

Czerkawski JW, Breckenridge G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). Br J Nutr. 1977 Nov;38(3):371-84.

Dahlhoff S, Sommer W. Hufrehe durch Fruktane im Weidegras? 2004 (zitiert vom 14.12.2007):

<http://www.lkwld.de/fachangebot/tierproduktion/pferdehaltung/fuetterung/hufrehe-fruktan.htm>.

Daly K SC, Flint HJ, Shirazi-Beechey SP. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. FEMS Microbiol Ecol. 2001;38:141-51.

De Boever JL, Cottyn BG, Buysse FX, Wainman FW, Vanacker JM. The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. Animal Feed Science and Technology. 1986;14(3-4):203-14.

Literaturverzeichnis

De Fombelle A, Varloud M, Goachet A-G, Jacotot E, Philippeau C, Drogoul C, Julliand V. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. *J Anim Sci.* 2003;77:293-304.

De Fombelle A, Veiga L, Drogoul C, Julliand V. Effect of diet composition and feeding pattern on the prececal digestibility of starches from diverse botanical origins measured with the mobile nylon bag technique in horses. *J Anim Sci.* 2004 December 1, 2004;82(12):3625-34.

Demeyer D, de Graeve K, Durand M, Stevan J. Azetate: a hydrogen sink in hindgut fermentation as opposed to rumen fermentation. *Acta Vet Scand (Suppl).* 1989;68(68-75).

Destrez A, Grimm P, Cézilly F, Julliand V. Changes of the hindgut microbiota due to high-starch diet can be associated with behavioral stress response in horses. *Physiol Behav.* 2015 Oct 1;149:159-64.

Dill B, Engelmann W, Markuske KD, Zeyner A. Suitability of equine caecum content as inoculum in a modified 'Rumen Simulation Technique' – Preliminary results *Proc Soc Nutr Physiol.* 2006;15:162.

Dowman MG, Collins FC. . The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1982;33(8):689-96.

Drochner W. Intracecal infusion of volatile fatty acids and of combined substrates of urea and volatile fatty acids. *Advances in J Animal Physiol Animal Nutr.* 1987;17:59-64.

Drochner W, Meyer H. The digestion of organic substances in the colon of different kinds of domestic animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Germany, FR).* 1990.

Duncan SH, Scott KP, Ramsay AG, Harmsen HJ, Welling GW, Stewart CS, Flint HJ. Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentos system. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:1136-42.

Literaturverzeichnis

Eades SC, Holm MS, Moore RM. A Review of the Pathophysiology and Treatment of acute Laminitis: Pathophysiologic and Therapeutic Implications of Endothelin-1. AAEP Proceedings 2002; 48.

Ebisu S, Kato K, Kotani S, Misaki A. Structural differences in fructans elaborated by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. J Biochem (Tokyo). 1975;78:879-87.

Eckert E. Tierphysiologie. Verlag Thieme, Stuttgart, New York 1993;2. Aufl.

El-Shazly K, Hungate RE. Fermentation Capacity as a Measure of Net Growth of Rumen Microorganisms. Appl Microbiol. 1965 Jan;13:62-9.

Endo A, Okada S, Morita H. Molecular profiling of *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium* species in feces of active racehorses. J Gen Appl Microbiol. 2007;53:191-200.

Engelmann W, Dill B, Markuske KD, Aschenbach JR, Zeyner A. Investigations on chronic incubation of equine caecum content with fructan in a modified 'Rumen Simulation Technique' Proc Soc Nutr Physiol 2007;16.

Engelmann W, Dill B, Markuske KD, Zeyner A. Comparison of equine caecum content and faeces as inocula in a modified 'Hohenheim Gas Test' with different substrates. Proc Soc Nutr Physiol. 2006;15.:S. 162.

Eugène M, Archimède H, Michalet-Doreau B, Fonty G. Effects of defaunation on microbial activities in the rumen of rams consuming a mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate). Anim Res. 2004;53:187-200.

Figroid W, Hale WH, Theurer B. An evaluation of the nylon bag technique for estimating rumen of grains. J Anim Sci. 1972 Jul;35(1):113-20.

Fleming SE, Arce DS. Volatile fatty acids: their production, absorption, utilization, and roles in human health. Clin Gastroenterol. 1986 Oct;15(4):787-814.

Literaturverzeichnis

Flickinger EA, Fahey GC, Jr. Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. *Br J Nutr.* 2002 May;87 Suppl 2:S297-300.

Frank N. Insulin resistance in horses. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners.* 2006;52:51-4.

French KR, Pollitt CC. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. *Equine Vet J.* 2004a Apr;36(3):230-5.

French KR, Pollitt CC. Equine laminitis: cleavage of laminin 5 associated with basement membrane dysadhesion. *Equine Vet J.* 2004b Apr;36(3):242-7.

Fukata T, Sasai K, Miyamoto T, Baba E. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly and in combination, on *Salmonella* colonization of chicks. *J Food Prot.* 1999 Mar;62(3):229-33.

Galey FD, Whiteley HE, Goetz TE, Kuenstler AR, Davis CA, Beasley VR. Black walnut (*Juglans nigra*) toxicosis: a model for equine laminitis. *J Comp Pathol.* 1991 Apr;104(3):313-26.

Garcia JL, Patel BKC, Ollivier B. Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe.* 2000;6(4):205-26.

Garner HE, Coffman JR, Hahn AW, Hutcheson DP, Tumbleson ME. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. *Am J Vet Res.* 1975 Apr;36(4 Pt.1):441-444.

Garner HE, Hutcheson DP, Coffman JR, Hahn AW, Salem C. Lactic acidosis: a factor associated with equine laminitis. *J Anim Sci.* 1977 Nov;45(5):1037-41.

Garner HE, Moore JN, Johnson JH, Clark L, Amend JF, Tritschler LG, Coffmann JR, Sprouse R F, Hutcheson D P, Salem C A. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet J.* 1978 Oct;10(4):249-52.

Literaturverzeichnis

Garner MR, Flint JF, Russel JB. *Allisonella histaminiformans* gen. nov., sp. nov. A novel bacterium that produces histamine, utilizes histidine as its sole energy source, and could play a role in bovine and equine laminitis. *Syst Appl Microbiol* 2002;25:498-506.

Gänzle MG, Follador R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *f microb.* 2012;3(340)(doi:10.3399/fmicb.2012.00340).

Gavini F, Delcenserie V, Kopeinig K, Pollinger S, Beerens H, Bonaparte C, Upmann M. *Bifidobacterium* species isolated from animal feces and from beef and pork meat. *J Food Prot.* 2006;69(4):871-7.

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995 Jun;125(6):1401-12

Glinsky MJ, Smith RM, Spires HR, Davis CL. Measurement of volatile fatty acid production rates in the cecum of the pony. *J Anim Sci.* 1976;42(6):1465-70.

Goering HK, van Soest PJ. Forage fibre analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). *Agrioc Handbook.* 1970;379(ARS-USDA, Washington, DC.):zit. nach Getachew et al. (1998)

Goodson J, Tyznik WJ, Cline JH, Dehority BA. Effects of an abrupt diet change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54:1946-50.

Graf W. Kraftwerk Wiese. Strom und Wärme aus Gras. Books on Demand. 1999.

Graham H, Aman P, Newman RK, Newman CW. Use of a nylon-bag technique for pig feed digestibility studies. *Br J Nutr.* 1985 Nov;54(3):719-26.

Greiss C. Bakteriologische Untersuchungen zur quantitativen Zusammensetzung der aeroben und anaeroben Dickdarmflora von Pferden mit Typhlocolitis und Koliksymptomatik. [Dissertation med vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1995.

Literaturverzeichnis

Hancock R, Marshall K, Weigel H. Structure of the levan elaborated by *Streptococcus salivarius* strain 51: an application of chemical ionisation mass-spectrometry. *Carbohydr Res.* 1976;49:351-60.

Harris P, Bailey SR, Elliott J, Longland A. Countermeasures for pasture-associated laminitis in ponies and horses. *J Nutr.* 2006 Jul;136(7 Suppl):2114S-21S.

Hartmeier W, Reiss M, Heidel M, Marx SP. Biochemical and economical aspects of levan synthesis by *Zymomonas mobilis*. *Biocatalysis.* 1994.;10:131-6.

Hendry GAF. Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist.* 1993;123(1):3-14.

Heyer A, Schroeder B, Radosta S, Wolff D, Czaplak S, Springer J. Structure of the enzymatically synthesized fructan inulin. *Carbohydr Res.* 1998;313:165-74.

Hintz HF, Argenzio RA, Schryver HF. Digestion coefficients, blood Glucose levels and molar percentage of volatile acids in intestinal fluid of ponies fed varying forage-grain ratios. *J Anim Sci.* 1971 Nov;33(5):992-5.

Hoffman RM, Boston RC, Stefanovski D, Kronfeld DS, Harris PA. Obesity and diet affect Glucose dynamics and insulin sensitivity in thoroughbred geldings. *J Anim Sci.* 2003;81:2333-42.

Hoffman RM, Wilson JA, Kronfeld DS, Cooper WL, Lawrence LA, Sklan D, et al. Hydrolyzable carbohydrates in pasture, hay, and horse feeds: direct assay and seasonal variation. *J Anim Sci.* 2001 February 1, 2001;79(2):500-6.

Hofmann AF, Eckmann L. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *PNAS.* 2006;103(12):4333-4.

Holden LA. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *J Dairy Sci.* 1999 Aug;82(8):1791-4.

Literaturverzeichnis

Holt D, Hilst AR. Daily variation in carbohydrate content of selected forage crops

Agron J. 1969;61:239.

Hood DM, Grosenbaugh DA, Mostafa MB, Morgan SJ, Thomas BC. The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. *J Vet Intern Med.* 1993 Jul-Aug;7(4):228-34.

Huntington P, Pollitt CC. Nutrition and the equine foot. *Proc 2002 Equine Nutrition Conf Kentucky Equine Research, Lexington.* 2002:149-62.

Inagaki T, Moschetta A, Lee Y-K, Peng L, Zhao G, Downes M, Yu RT, Shelton JM, Richardson JA, Repa JJ et al. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2006;103:3920-5.

Jouany J-P, Medina B, Bertin G, Julliand V. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glucoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J Anim Sci.* 2009;87:2844-52.

Jenkins DJ, Kendall CW, Vuksan V. Inulin, oligofructose and intestinal function. *J Nutr.* 1999 Jul;129(7 Suppl):1431S-3S.

Johnson PJ, Kreeger JM, Keeler M, Ganjam VK, Messer NT. Serum markers of lamellar basement membrane degradation and lamellar histopathological changes in horses affected with laminitis. *Equine Vet J.* 2000 Nov;32(6):462-8.

Johnson PJ. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2002;18:271–293.

Jones DIH, Hayward MV. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1975;26(5):711-8.

Julliand V, de Fombelle A, Drogoul C, Jacotot E. Feeding and microbial disorders in horses: part 3 - Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. *J Equine Vet Sci.* 2001;21:543-6.

Literaturverzeichnis

Julliard V, de Vaux A, Millet L. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the Predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:3738-41.

Kamphues A. Untersuchungen zu Verdauungsvorgängen bei Absatzferkeln in Abhängigkeit von Futtermenge und -zubereitung sowie von Futterzusätzen. [Habilschr. Med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1987.

Kamphues A. Lipopolysaccharid-Konzentrationen im Magen-Darm-Trakt von Ponys nach Aufnahme von Heu bzw. einer kraftfutterreichen Ration. *Pferdeheilkunde Sonderheft.* 1992:59-62.

Kern DL, Slyter LL, Leffel EC, Weaver JM, Oltjen RR. Ponies vs. steers: microbial and chemical characteristics of intestinal ingesta. *J Anim Sci.* 1974 Mar;38(3):559-64.

Kern DL, Slyter LL, Weaver JM, Leffel EC, Samuelson G. Pony cecum vs. steer rumen: the effect of oats and hay on the microbial ecosystem. *J Anim Sci.* 1973 Aug;37(2):463-9.

Kienzle E. Untersuchungen zur Enzymkapazität der Katze zur Stärkeverdauung. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 1987;58(1-2):29.

Kienzle E. Enzymaktivität in Pancreas, Darmwand und Chymus des Hundes in Abhängigkeit von Alter und Futterart. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 1988;60(1-5):276-88.

Kienzle E, Radicke S, Wilke S, Landes E, Meyer, H. Praeileale Stärkeverdauung in Abhängigkeit von Stärkeart und -zubereitung. *Pferdeheilkd* 1992(Sonderausgabe Ernährung I):103-6.

Kienzle E, Radicke S, Landes E, Kleffken D, Illenseer M, Meyer H. Activity of amylase in the gastrointestinal tract of the horse. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 1994;72:234-41.

Kienzle E, Pohlenz J, Radicke S. Morphology of starch digestion in the horse. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1997 Jun;44(4):207-21.

Literaturverzeichnis

Kienzle E, Zeyner A. The development of a metabolizable energy system for horse. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2010;94:e231-e240, doi:10.1111/j.1439-0396.2010.01015.x.

Kirchgessner M. Tierernährung. DLG-Verlag. 2004.

Kleessen B, Schwarz S, Boehm A, Fuhrmann H, Richter A, Henle T, Krueger M. Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. *Br J Nutr.* 2007;98(3):540-9.

Kocsár L, Bertók L, Várterész V. Effect of bile acids on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *J Bacteriol.* 1969;100(200).

Korakli M, Ganzle MG, Vogel RF. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Appl Microbiol.* 2002;92:958-65.

Köpke K. Prüfung stärkehaltiger und probiotikasupplementierter Rationen für Pferde mittels In-vitro-Verfahren. [Dissertation med. vet.] Leipzig: Univ. Leipzig; 2010

Kronfeld D, Harris PA. Equine grain-associated disorders (EGAD). *Compendium on continuing education for the practising veterinarian.* 2003;25:974-83.

Kronfeld DS, Treiber KH, Hess TM, Splan RK, Byrd BM, Staniar WB, et al. Metabolic syndrome in healthy ponies facilitates nutritional countermeasures against pasture laminitis. *J Nutr.* 2006 Jul;136(7 Suppl):2090S-3S.

Landes E. Amylaseaktivität und Konzentration organischer Säuren im Jejunum- und Caecumchymus des Pferdes nach Hafer- und Maisfütterung. [Dissertation med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1992

Lattimer JM, Cooper SR, Freeman DW, Lalman DL. Effect of yeast culture on in vitro fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculum in a Daisy II incubator. *J Anim Sci.* 2007 October 1, 2007;85(10):2484-91.

Literaturverzeichnis

Launer P, Mill J, Richter W. Krankheiten der Reitpferde. 1. Aufl. Stuttgart. Verlag Eugen Ulmer, Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin. 1990

Lechtenberg V, Holt DA, Youngberg HW. Diurnal variation in non-structural carbohydrates, in vitro digestibility, and leaf to stem ratio of alfalfa. *Agron J agric Sci.* 1971;63:719.

Lewis LD. Feeding and care of the horse. Verlag Lippincott Williams & Wilkins. 1996;2. Aufl.

Li S, Khafipour E, Krause DO, Kroeker A, Rodriguez-Lecompte JC, Gozho GN, Plaizier JC. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2012;95(1):294-303.

Li Y, Triccas J. A., Ferenci T. A novel levansucrase-levanase gene cluster in *Bacillus stearothermophilus* ATCC12980. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1353::203-8.

Longland AC, Byrd BM. Pasture Nonstructural Carbohydrates and Equine Laminitis. *J Nutr.* 2006 July 1, 2006;136(7):2099S-102.

Longland AC, Crains AJ. Fructans and their Implications in the Development of Laminitis in Horses at Grass. *Dodson & Horrell Ltd 3rd International Conference on Feeding Horses* 2000:3-5.

Longland AC, Cairns AJ, Humphreys MO. Seasonal and diurnal changes in fructan concentration in *Lolium perenne*: implications for the grazing management of equine predisposed to laminitis. *Proceedings of the 16th equine nutrition and physiology society symposium, Raleigh, NC 1999;June 2-5:258-9.*

Longland AC, Murray JM. Effect of two varieties of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne*) differing in fructan content on fermentation parameters in vitro when incubated in vitro with a pony faecal inoculum. *Proc 18th Equine Nutr Physiol Symp.* 2003:144-5.

Lowman RS. Investigations into the factors which influence measurements during in vitro gas production studies. Thesis (PhD) University of Edinburgh. 1998.

Literaturverzeichnis

Macfarlane S, Macfarlane GT. Bacterial diversity in the human gut. *Adv Appl Microbiol.* 2004;54:261-89.

Mah RA, Ward DM, Baresi L, Glass TL. Biogenesis of methane. *Ann Rev Microbiol.* 1977;31:309-41.

Manley-Harris M, Richards GN. Di-D-fructose dianhydrides and related oligomers from thermal treatments of inulin and sucrose. *Carbohydr Res.* 1996 Jun 21;287(2):183-202.

Martin C, Michalet-Doreau B, Fonty G, Williams A. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes of fluid- and particle-associated ruminal microbial population. *Curr Microbiol.* 1993;27(223-228).

McBee RH. A Manometric Method for the Evaluation of the Microbial Activity of the Rumen with an Application to the Utilization of Cellulose and Hemicelluloses. *Appl Microbio.* 1953; 1(2):106-10.

Medina B, Jacotot E, Julliand V. Effect of a live yeast culture on the microbial enzymatic activities in the equine hindgut fed high fibre or high starch diets. *Proc 17th Equine Nutr Physiol Symp.* 2001:474-6.

Medina B, Girard ID, Jacotot E, Julliand V. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *J Anim Sci.* 2002;80:2600-9.

Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J agric Sci.* 1979;93:217-22.

Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev.* 1988;28:7-55.

Meyer H. Einfluß der Ernährung auf die Entstehung von Koliken (Verdauungsstörungen) beim Pferd. *Tierärztl Prax.* 1991;19:515-20.

Literaturverzeichnis

Meyer H, Coenen M. Pferdefütterung. 4th ed Paray Buchverlag 2002; Berlin.

Meyer H, Lindemann G, Schmidt M. Einfluß unterschiedlicher Mischfuttermengen pro Mahlzeit auf präcaecale und postileale Verdauungsvorgänge beim Pferd. *Z Tierphysiol, Tierernährg, Futtermittelkd, Beiheft.* 1982;13:32-9.

Meyer H, Radicke S, Kienzle E, Wilke S, Kleffken D, Illenseer M. Investigations on preileal digestion of starch from grain, potato and manioc in horses. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1995 Aug;42(6):371-81.

Milnovich GJ, Burrell PC, Pollitt CC, Klieve AV, Blackall LL, Ouwerkerk D, Woodland E, Trott DJ. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *ISME Journal.* 2008;2:1089-100.

Milnovich GJ, Trott DJ, Burrell PC, Croser EL, Al Jassim RA, Morton JM, van Eps AW, Pollitt CC. Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environ Microbiol.* 2007 Aug;9(8):2090-100.

Milnovich GJ, Trott DJ, Burrell PC, van Eps AW, Thoenner MB, Blackall LL, Al Jassim RA, Morton JM, Pollitt CC. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environ Microbiol.* 2006 May;8(5):885-98.

Miller TL, Wolin M. Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition* 1979;32:164-72.

Minnick PD, Brown CM, Braselton WE, Meerdink GL, Slanker MR. The induction of equine laminitis with an aqueous extract of the heartwood of black walnut (*Juglans nigra*). *Vet Hum Toxicol.* 1987 Jun;29(3):230-3.

Mitsuoka T, Hidaka H, Eida T. Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora. *Nahrung.* 1987;31(5-6):427-36.

Moore JN, Allen D. The pathophysiology of acute laminitis. *Vet Med* 1996; 91: 936-939

Literaturverzeichnis

Moore RM, Eades SC, Stokes AM. Evidence for vascular and enzymatic events in the pathophysiology of acute laminitis: which pathway is responsible for initiation of this process in horses? *Equine Vet J.* 2004; 36: 204-209

Moore-Colyer MJ, Morrow HJ, Longland AC. Mathematical modelling of digesta passage rate, mean retention time and in vivo apparent digestibility of two different lengths of hay and big-bale grass silage in ponies. *Br J Nutr.* 2003 Jul;90(1):109-18.

Morgan SJ, Hood DM, Wagner IP, Postl SP. Submural histopathologic changes attributable to peracute laminitis in horses. *Am J Vet Res.* 2003 Jul;64(7):829-34.

Möbeler A. Effekte verschiedener Kohlenhydrate (Cellulose, Pektin, Stärke und Inulin) auf die Wasserstoff- und Methanexhalation beim gesunden Pferd. [Dissertation med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule; 2004

Mueller A-M, Gall D, Bremer S, Zeyner A. Effect of the preservation of equine faeces as inokulum on fermentation patterns in the semi-continuous fermentation technique Caesitec. *ESVCN Proc 13th Congr European Soc Vet Comp Nutr, Oristano, Italy.* 2009:160.

Mueller A-M, Gall D, Bremer S, Zeyner A. Suitability of differently harvested and prepared equine faeces as inoculum in the semi-continuous fermentation technique Caesitec. *ESVCN Proc 12th Congr European Soc Vet Comp Nutr, Wien, Austria.* 2008:117.

Murray JA, Longland AC, Moore-Colyer MJ, Dunnett C. The effect of enzyme treatment on the in vitro fermentation of lucerne incubated with equine faecal inocula. *Br J Nutr.* 2005 Nov;94(5):771-82.

Muschick M. Fruktansynthese in Graminaeen: Identifikation, Reinigung und Charakterisierung von Fruktan: Fruktan Fruktosyltransferasen zum Aufbau von Phleinen und Graninanen. [Dissertation rer. nat.] Zürich: Eidgenössische Technische Hochschule; 1998.

Niness KR. Inulin and oligofructose: what are they? *J Nutr.* 1999 Jul;129(7 Suppl):1402S-6S.

Nourian AR, Baldwin GI, van Eps AW, Pollitt CC. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24-30 hours after induction with oligofructose. *Equine Vet J.* 2007 Jul;39(4):360-4.

Literaturverzeichnis

Northfield TC IM. postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. *Gut*. 1973;14:513-8.

Nousiainen J, Rinne M, Hellämäki M, Huhtanen P. Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Animal Feed Science and Technology*. 2003;103(1-4):97-111.

Nyari A. Untersuchungen zur postprandialen H₂- und CH₄ - Exhalation beim Pferd. [Dissertation med vet.] Hannover: Tierärztl Hochsch; 1992.

Olivares-Illana V, Wachter-Rodarte C, Le Borgne S, Lo'pez-Mungui'a A. Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage from Mayan origin. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2002;28:112-7.

Onishi JC, Park J-W, Prado J, Eades SC, Mirza MH, Fugaro MN, Häggblom MM, Reinemeyer CR. Intestinal bacterial overgrowth includes potential pathogens in the carbohydrate overload models of equine acute laminitis. *Vet Microbiol*. 2012: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.005>.

Orpin CG. Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. *J Gen Microbiol*. 1981 Apr;123(2):287-96.

Pell AN, Schofield P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J Dairy Sci*. 1993 Apr;76(4):1063-73.

Philippeau C, Varloud M, Julliand V. Mobile bag starch prececal disappearance and postprandial glycemic response of four forms of barley in horses. *J Anim Sci*. 2014 May;92(5):2087-93.

Philippeau C, Sadet-Bourgeteau S, Varloud M, Julliand V. Impact of barley form on equine total tract fibre digestibility and colonic microbiota. *Animal*. 2015 Dec;9(12):1943-8.

Literaturverzeichnis

Plumhoff M-S. Bildung (Menge und Dynamik) von Fermentationsprodukten von Futtermitteln mit unterschiedlichen Gehalten an fermentierbaren Kohlenhydraten in einem in-vitro System mit Faeces von Pferden. [Dissertation med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule; 2004.

Pollitt CC, Molyneux GS. A scanning electron microscopical study of the dermal microcirculation of the equine foot. *Equine Vet J.* 1990; 22 (2): 79-87

Pollitt CC, Pass, MA, Pollitt, S. Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. *Equine Vet J Suppl.* 1998;26:119-24.

Pollitt CC, Kyaw-Tanner M, French KR, Van Eps AW, Hendrikz JK, Daradka M. Equine laminitis. 49th Annual convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, LA. 2003.

Pollock CJ. Tansley review no. 5 Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist.* 1986 September 1986;Volume 104 , (Issue 1):Page 1-24.

Pollock CJ, Cairns AJ. Fructan Metabolism in Grasses and Cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 1991;42(1):77-101.

Pollock CJ, Suzuki M. Extraction and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in timothy (*Phleum pratense*). *Can J Bot.* 1986;64((9):):1884-7

Potter GD, Arnold FF, Householder DD, Hansen DH, Brown KM. Verdauung von Stärke im Dünn- oder Dickdarm des Pferdes. *Pferdeheilkd*, 1. Europäische Konferenz über die Ernährung des Pferdes, 1992 (Sonderausgabe Ernährung I):107-11.

Puebla AF, Salerno GL, Pontis HG. Fructan metabolism in two species of *Bromus* subjected to chilling and water stress. *New Phytologist.* 1997;136(1):123-9.

Quin JI, Van der Wath JG, Myburgh S. Studies on the alimentary tract of merino sheep in south Africa: 4. Description of experimental technique. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Industry.* 1938 zit. nach Lowman (1998)11:341-60.

Literaturverzeichnis

Quin JI. Studies on the alimentary tract of merino sheep in south Africa: 7. Fermentation in the forestomach of sheep. Onderstepoort J Vet Sci Anim Industry. 1943 zitiert nach Williams (2000).2:91-117.

Radicke S. Untersuchungen zur Verdauung von Mais- und Haferstärke beim Pferd. [Dissertation med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1990.

Radicke S, Kienzle E, Meyer H. Preileal apparent digestibility of oats and corn starch and consequences for cecal metabolism. Equine Science Society, editor Proceedings of the 12th Equine Nutrition and Physiology Symposium. 1991;6-8:43-8.

Radicke S, Kienzle E, Meyer H. Aktivität der Amylase im Darmkanal des Pferdes in Abhängigkeit der Futterart. Pferdeheilkd, 1 Europäische Konferenz über die Ernährung des Pferdes. 1992:99-102.

Ralston SL, Freeman DE, Baile CA. Volatile fatty acids and the role of the large intestine in the control of feed intake in ponies. J Anim Sci. 1983 Oct;57(4):815-25.

Reisinger N, Schaumberger S, Schatzmayr G. Influence of endotoxins and thermolysin in an ex vivo model of equine laminitis. Animal hygiene and sustainable livestock production. Proceedings of the XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene, Vienna, Austria. 2011;3:1175-7

Respondek F, Goachet AG, Julliand V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change in diet. J ANIM SCI , 2008 doi: 10.2527/jas.2006-782;86::316-23.

Ringler J, Cassill B, Hayes S, Lawrence L. Comparison of in vitro digestibility estimates using the Daisy II incubator to in vivo digestibility estimates. Proc 19th Equine Sci Soc, Tuscon, AZ. 2005: 43-4.

Roberfroid M, Gibson GR, Delzenne N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. Nutr Rev. 1993 May;51(5):137-46.

Literaturverzeichnis

Roberfroid MB. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol.* 1997;427:211-9.

Roberfroid MB, Delzenne NM. Dietary fructans. *Annu Rev Nutr.* 1998;18:117-43.

Roberts MC. Amylase activity in the small intestine of the horse. *Res Vet Sci.* 1974 Nov;17(3):400-1.

Robertson JA, Murison SD, Chesson A. Estimation of the potential digestibility and rate of degradation of water-insoluble dietary fiber in the pig cecum with a modified nylon bag technique. *J Nutr.* 1987 Aug;117(8):1402-9.

Robyt J, Walseth TF. Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr Res.* 1979;68:95-111.

Roediger WE. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut.* 1980 Sep;21(9):793-8.

Rooney LW, Pflugfelder RL. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J Anim Sci.* 1986 Nov;63(5):1607-23.

Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S, et al. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Oct;71(10):6150-8.

Rowe J, Lees MJ, Pethick DW. Prevention of acidosis and laminitis associated with grain feeding in horses. *J Nutr* 1994;124:2742S-4S.

Rowe JB, Pethick DW, Johnson KG. Controlling acidosis in the equine hindgut. In *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* Rowe, JB, Nolan, JV (eds) 1995;Armidale, New South Wales, Australia: Department of Animal Science, University of New England:136-42.

Salyers AA, Palmer JK, Wilkins TD. Degradation of polysaccharides by intestinal bacterial enzymes. *Am J Clin Nutr.* 1978 Oct;31(10 Suppl):S128-S30.

Literaturverzeichnis

Salyers AA, West SE, Vercellotti JR, Wilkins TD. Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl Environ Microbiol.* 1977 Nov;34(5):529-33.

Sasaki N, Hobo S, Yoshihara T. Measurement for Breath Concentration of Hydrogen and Methane in Horses. *J Vet Med Sci.* 1999;61((9)):1059 -62.

Schnyder H, Nelson CJ. Growth Rates and Assimilate Partitioning in the Elongation Zone of Tall Fescue Leaf Blades at High and Low Irradiance. *Plant Physiol.* 1989 Jul;90(3):1201-6.

Schnyder H, Nelson CJ, Spollen WG. Diurnal Growth of Tall Fescue Leaf Blades : II. Dry Matter Partitioning and Carbohydrate Metabolism in the Elongation Zone and Adjacent Expanded Tissue. *Plant Physiol.* 1988 Apr;86(4):1077-83.

Schubiger FX, Bosshard H-R, Lehmann J. Nicht-strukturbildende Kohlenhydrate im Wiesenfutter. *Agrarforschung.* 1998;5(02):68.

Schulz H, Perwanger A, Mitterleitner H. Einsatzmöglichkeiten verschiedener Energieträger in der Landwirtschaft. Endbericht des Landestechnischen Vereins in Bayern eV, München. 1982.

Schünemann C, Mühlum A Junker S, Wilfarth H, Meyer H. Praececale und postileale Verdaulichkeit verschiedener Stärkearten sowie pH-Werte und Gehalte organischer Säuren in Darmchymus und Faeces. *Advances J Animal Physiol Animal Nutr.* 1989;19:44-55.

Shiroza T, Kuramitsu HK. Sequence analysis of the Streptococcus mutans fructosyltransferase gene and flanking regions. *J Bacteriol.* 1988;170:810-6.

Smart DR, Chatterton NJ, Bugbee B. The influence of elevated CO₂ on non-structural carbohydrate distribution and fructan accumulation in wheat canopies. *Plant Cell Environ.* 1994;17:435-42.

Smith HW. Observations on the Flora of the Alimentary Tract of Animals and Factors Affecting Its Composition. *J Pathol Bacteriol.* 1965 Jan;89:95-122.

Literaturverzeichnis

Solhaug KA, Aares E. Remobilization of fructans in *Phippsia algida* during rapid inflorescence development. *Physiologia Plantarum*. 1994;91(2):219-25.

Sonnenburg ED, Zheng H, Joglekar P, Higginbottom S, Firkbank SJ, Bolam DN, Sonnenburg JL. Specificity of polysaccharide use in intestinal *Bacteroides* species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell*. 2010;141(7):1241-52.

Sprouse RF, Garner HE, Green EM. Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate induced laminitis. *Equine Vet J*. 1987 Jan;19(1):25-8.

Sprouse RS, Garner HE. Proc 1 equine endotoxaemia laminitis sympNewsletter 2. 1982:116-9.

Stück K, Faul K, Hylla S, Stein J, Breves G. The application of a semi-continuous colon simulation technique (Cositec) for studying the effects of clindamycin on microbial hindgut metabolism. *Z Gastroenterol*. 1995 May;33(5):241-6.

Suzuki M. Fructans in forage grasses with varying degrees of coldhardiness. *Journal Of Plant Physiology* 1989;134:224-31.

Suzuki M, Nass HG. Fructan in winter wheat, triticale, and fall rye cultivars of varying cold hardiness. *Can J Bot*. 1988;66((9):):1723-8

Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Chow J, Wolf BW, Garleb KA, Fahey GC Jr. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. *J Nutr*. 2002 Dec;132(12):3721-31.

Tarini J, Wolever TMS. The fermentable fibre inulin increases postprandial serum short-chain fatty acids and reduces free-fatty acids and ghrelin in healthy subjects. *Appl Physiol Nutr Metabol*. 2010;35(1):9-16.

Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, Mc Allen AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol*. 1994;48:185-97.

Literaturverzeichnis

Thoefner MB, Pollitt CC, van Eps AW, Milinovich GJ, Trott DJ, Wattle O, Andersen PH. Acute Bovine Laminitis: A New Induction Model Using Alimentary Oligofructose Overload. *J Dairy Sci.* 2004 September 1, 2004;87(9):2932-40.

Thoefner MB, Wattle O, Pollitt CC, French KR, Nielsen SS. Histopathology of Oligofructose-Induced Acute Laminitis in Heifers. *J Dairy Sci.* 2005 August 1, 2005;88(8):2774-82.

Tieking M, Ehrmann MA, Vogel RF, Ganzle MG. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;66:655-63.

Tilley JMA, Terry RA. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J Br Grassld Soc.* 1963;18:104-11.

Tognetti JA, Salerno CL, Crespi MD, Pontis HG. Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiologia Plantarum.* 1990;78(4):554-9.

Treiber K, Boston RC, Kronfeld DS, Staniar WB, Harris PA. Insulin resistance and compensation in thoroughbred weanlings adapted to high-glycemic meals. *J Anim Sci* 2005;83:2357-64.

Treiber KH, Kronfeld DS, Geor RJ. Insulin resistance in equids: possible role in laminitis. *J Nutr.* 2006 Jul;136(7 Suppl):2094S-8S.

Treiber KH, Kronfeld DS, Hess TM, Byrd BM, Splan RK, Staniar WB. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J Am Vet Med Assoc.* 2006 May 15;228(10):1538-45.

Van Dyne GM. Micro-Methods for Nutritive Evaluation Of Range Forage. *Journal of Range Management.* 1962;15(6):303-14.

Van Eps AW, Pollitt CC. Equine laminitis induced with oligofructose. *Equine Vet J.* 2006 May;38(3):203-8.

Literaturverzeichnis

Van Geel-Schutten GH, Faber EJ, Smit E, Bonting K, Smith MR, Ten Brink B, Kamerling JP, Vliegthart JFG, Dijkhuizen L. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:3008-14.

Van Hijum SAFT, Van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, Van Der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:4390-8.

Van Hijum SAFT, Szalowska E, Van Der Maarel MJ EC, Dijkhuizen L. Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* 2004;150:621-30.

Van Hijum SAFT, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IGH. Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiol mol Biol Rev.* Mar. 2006 ;70(1):157-76.

Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, et al. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br J Nutr.* 1999 Feb;81(2):121-32.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 1991 Oct;74(10):3583-97.

Vervuert I, Coenen M, Dahlhoff S, Sommer W. Fructan concentrations in roughages for horses. *J Nutr.* 2006:136.

Vijn I, Smeekens S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* 1999;120:351-60.

Virgona JM, Barlow EWR. Drought Stress Induces Changes in the Non-Structural Carbohydrate Composition of Wheat Stems. *Functional Plant Biology.* 1991;18(3):239-47.

Literaturverzeichnis

Volaire F, Lelievre F. Production, persistence and water soluble carbohydrate accumulation in 21 contrasting populations of *Dactylis glomerata* L. subjected to severe drought in the south of France. *Aust J Agric Res.* 1997;48:933-44.

Vosmer J, Liesegang A, Wanner M, Zeyner A, Suter D, Hoelzle L, Wichert B. Fermentation of six different forages in the semi-continuous fermentation technique Caesitec. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 2012; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01269.x> 1439-0396.

Wang L, Pawlak EA, Johnson PJ, Belknap JK, Alfandari D, Black SJ. Expression and activity of collagenases in the digital laminae of horses with carbohydrate overload-induced acute laminitis. *Vet Intern Med.* 2014 Jan-Feb;28(1):215-22

Wang X, Gibson GR. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol.* 1993 Oct;75(4):373-80.

Wilke S. Zur praeilealen Verdaulichkeit von Hafer und Mais verschiedener Zubereitungen beim Pferd. [Dissertation med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1992.

Wilkins JR. Pressure Transducer Method for Measuring Gas Production by Microorganisms *Appl Microbiol.* 1974 Jan;27(1):135-40.

Willard JG, Willard JC, Wolfram SA, Baker JP. Effect of diet on cecal pH and feeding behavior of horses. *J Anim Sci.* 1977;45 (1): 87-93.

Williamson A, Rogers CW, Firth EC. A survey of feeding, management and faecal pH of thoroughbred racehorses in the North Island of New Zealand. *New Zeal Vet J.* 2007;55:337-41.

Wintzer H-J. Krankheiten des Pferdes, Ein Leitfaden für Studium und Praxis. Berlin, Parey Buchverlag Berlin. 1999.

Wolin MJ, Miller TL. Interactions of microbial populations in cellulose fermentation. *Fed Proc.* 1983 Jan;42(1):109-13.

Literaturverzeichnis

Yanase H, Maeda M, Hagiwara E, Yagi H, Taniguchi K, Okamoto K. Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J Biochem (Tokyo)*. 2002;132:565-72.

Yun H, Lee JH, Park CE, Kim MJ, Min BI, Bae H, Choe W, Kang I, Kim SS, Ha J. Inulin Increases Glukose Transport in C2C12 Myotubes and HepG2 Cells via Activation of AMP-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways. *J Med Food*. 2009;12(5):1023-8; DOI: 10.89/jmf.2009.0128.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*. 1974;14(6):415-21.

Zajic JE, Kosaric N, Brosseau JD. Microbial production of hydrogen. *Advances in Biochemistry and Engineering*. 1978;9:57-109.

Zentek J. Mikrobielle Gasbildung im Intestinaltrakt von Monogastriern Teil I: Entstehung, Lokalisation, Qualiät, Quantität. *Übers Tierernährg* 1991;19:273-312.

Zentek J. Mikrobielle Gasbildung im Intestinaltrakt von Monogastriern Teil II: Pulmonale Ausscheidung von Wasserstroff und Methan. *Übers Tierernährg*. 1992;20:91-122.

Zerpa H, Vega F, Vasquez J, Ascanio E, Campos G, Sogbe E, et al. Effect of acute sublethal endotoxaemia on in vitro digital vascular reactivity in horses. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2005 Mar;52(2):67-73.

Zeyner A. Verdauungsphysiologie von Ileum und Caecum beim Pferd. *Pferdeheilkunde*. 2003;19:391-6.

Zeyner A. Ernährungsphysiologische Wirkungen eines Austausches von stärkereichen Komponenten durch Sojaöl in der Reitpferdeernährung. Göttingen: Habilitation thesis. 2002;aus: Zeyner A, Bosch B, Markuske KD, Fuerll M, Krüger M Fermentation of selected substrates in vitro using a batch culuture with equine faeces as inoculum. *Pferdeheilkunde*. 2005; 21:67-68

Literaturverzeichnis

Zeyner A, Dittrich, A. Estimation of digestible energy in horse diets using an in vitro method. *Pferdeheilkunde* 2005;21(Suppl. 1):53-4.

Zeyner A, Engelmann W, Dill B, Markuske KD, Aschenbach J. Effects of slowly increasing fructan load on equine caecum content in a semicontinuous in vitro technique (Caesitec). *ESVCN Proc 11th Congr European Soc Vet Comp Nutr, Leipzig, Germany. 2007:p. 51.*

Zeyner A, Geißler C, Dittrich A. Effects of hay intake and feeding sequence on variables in faeces and faecal water (dry matter, pH value, organic acids, ammonia, buffering capacity) of horses. *J Anim Physiol An N.* 2004;88:7-19.

Zeyner A, Geißler C, Kaske H, Fuchs R. Untersuchungen zur Beurteilung der Futterration mittels Kotwasseranalysen (Wasser, pH, org. Säuren). *Pferdeheilkd, Sonderausgabe, 1. Europäische Konferenz über die Ernährung des Pferdes.* 1992:88-91

Ziolecki A, Guczynska W, Wojciechowicz M. Some rumen bacteria degrading fructan. *Letters in Applied Microbiology.* 1992;15:244-7.

IX Anhang

9.1 Abbildungen

9.1.1 Material und Methoden

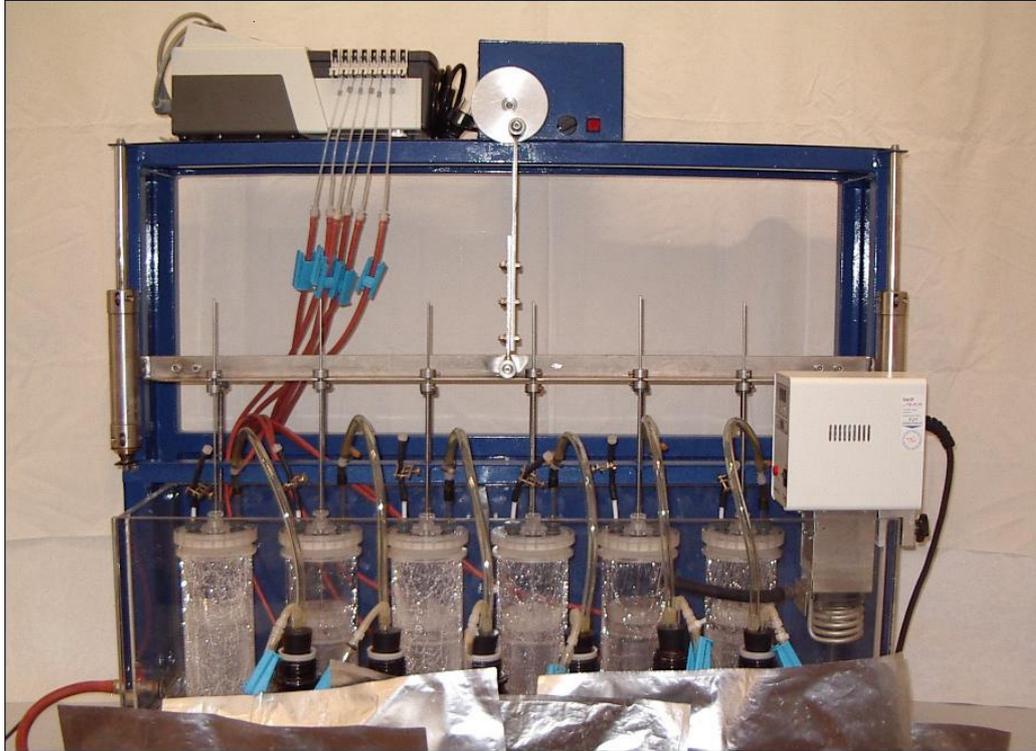


Abb. 1: Caesitec-Inkubator (Foto Engelmann 2005)

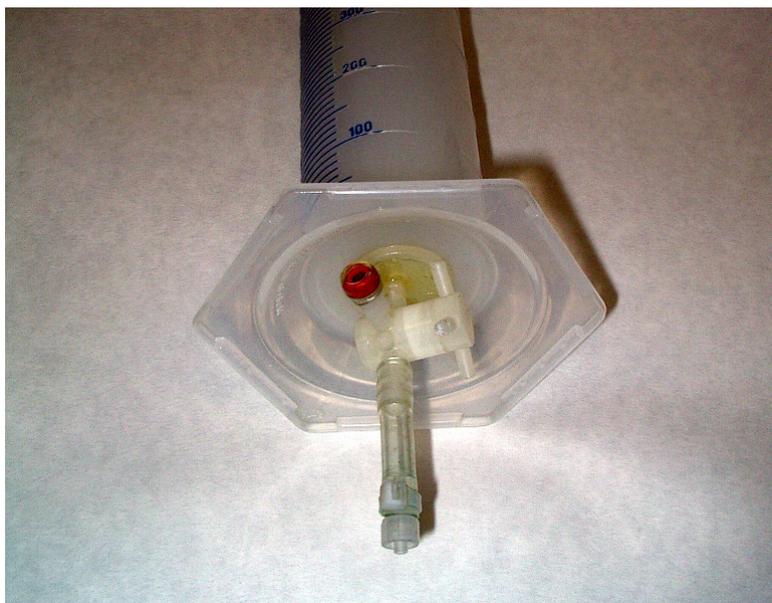


Abb. 2: Gasmesszylinder mit Dreiwegehahn, Probenentnahmeventil und Gasbeuteladapter an Zylinderboden (Foto Engelmann 2005)

9.1.2 Ergebnisse

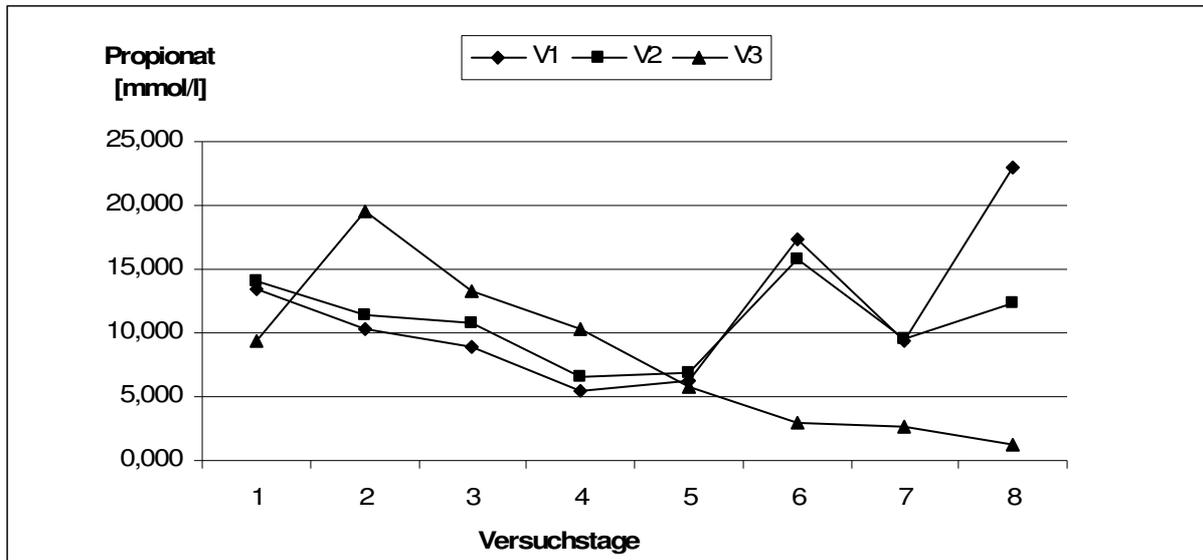


Abb. 3: Mittelwerte der Konzentration an Propionat (mmol/l) in der Inkubationsflüssigkeit der Caesitec-Probenfermenter der einzelnen Versuche (V1, V2, V3)

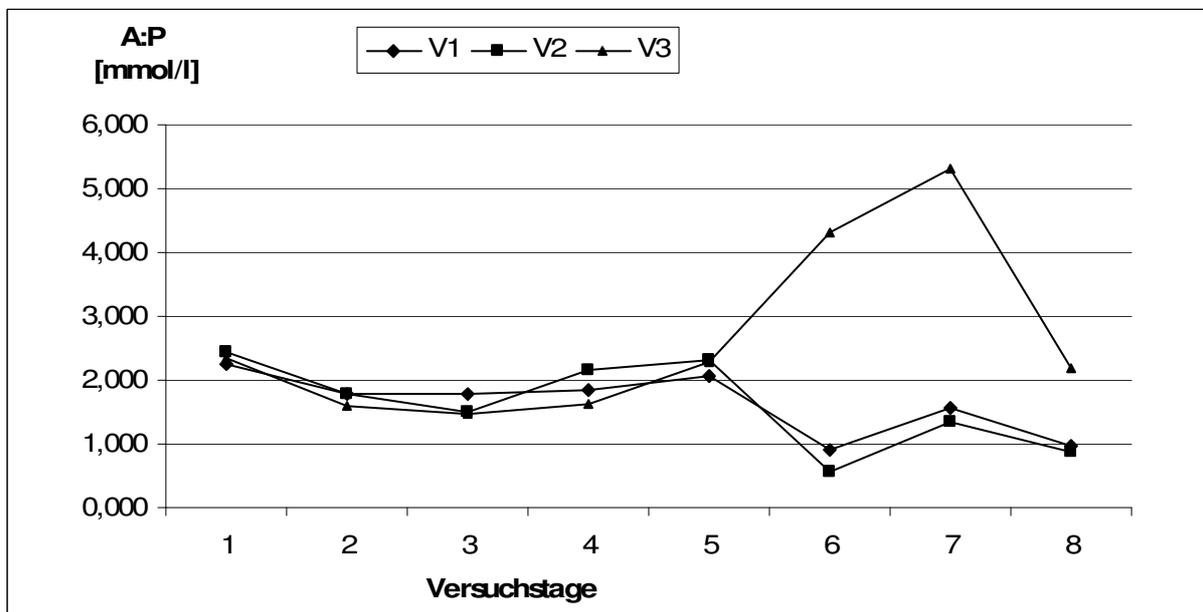


Abb. 4: Mittelwerte des Azetat-Propionat-Quotienten (A:P) (mmol/l) in der Inkubationsflüssigkeit der Caesitec-Probenfermenter der einzelnen Versuche (V1, V2, V3)

Anhang

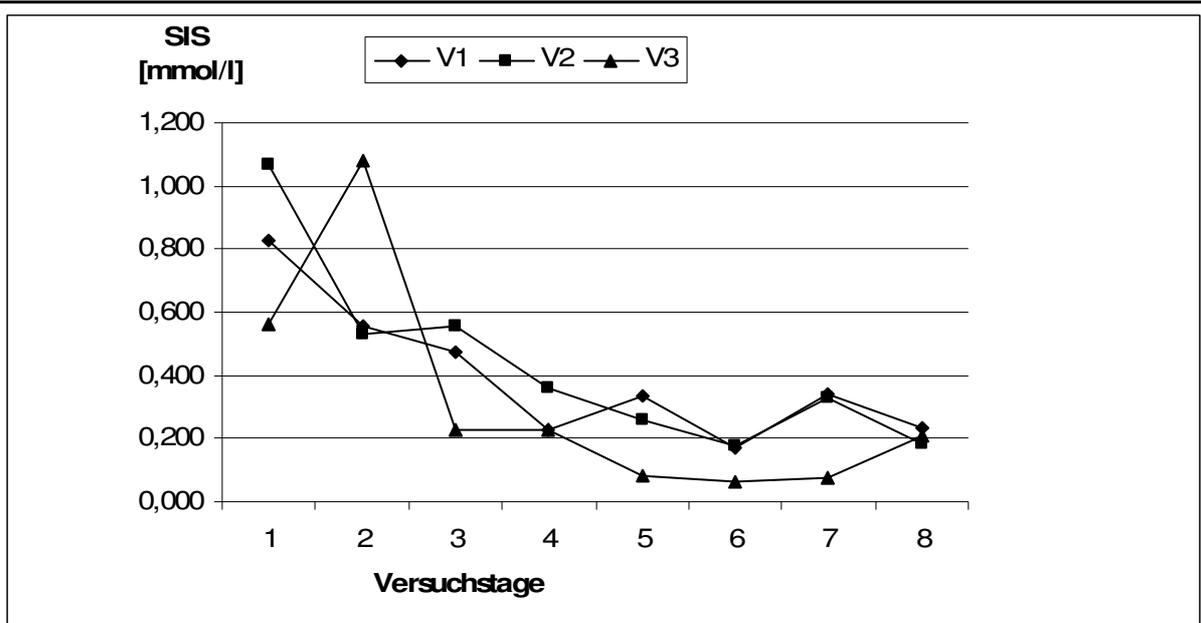


Abb. 5: Mittelwerte der Summe von Iso-Fettsäuren (SIS) (mmol/l) in der Inkubationsflüssigkeit der Caesitec-Probenfermenter der einzelnen Versuche (V1, V2, V3)

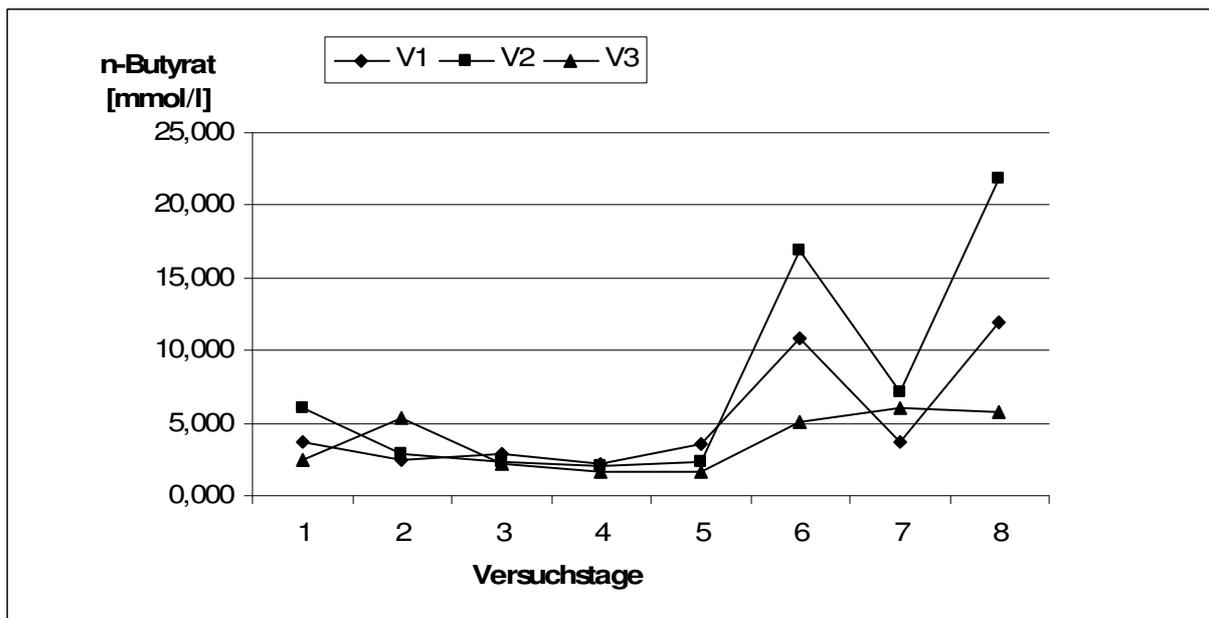


Abb. 6: Mittelwerte der Konzentration an n-Butyrat (mmol/l) in der Inkubationsflüssigkeit der Caesitec-Probenfermenter der einzelnen Versuche (V1, V2, V3)

Anhang

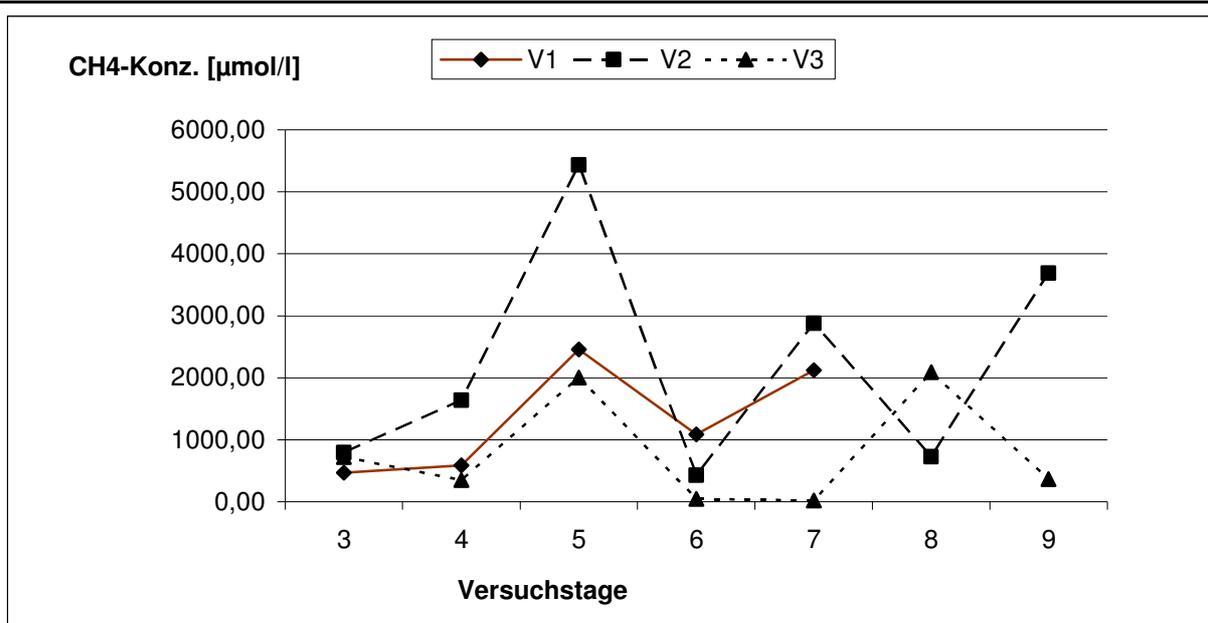


Abb. 7: Mittelwerte der Methankonzentration (CH_4) in $\mu\text{mol/l}$ in produzierter Gasmenge der Probenfermenter der einzelnen Caesitec-Versuche (V1, V2, V3)

9.2 Tabellen

9.2.1 Literatur

Tab. 1: Ausgewählte Vertreter der Kohlenhydrate mit Bindungsform und Summenformel

KOHLHYDRAT	BINDUNGSFORM	SUMMENFORMEL
I. Monosaccharide		
Glukose	Aldohexose	$C_6H_{12}O_6$
Fruktose	Ketohexose	$C_6H_{12}O_6$
Ribose	Aldopentose	$C_5H_{10}O_5$
Desoxyribose	Aldopentose	$C_5H_{10}O_4$
II. Oligosaccharide		
Saccharose	(Glukose + Fruktose) α, β -1,2-glycosidisch	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Laktose	(Galaktose + Glukose) β -1,4-glycosidisch	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Laktulose	(Galaktose + Fruktose) β -1,4-glycosidisch	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Raffinose	(Galaktose + Glukose + Fruktose) α -1,6-glykosidischer	$C_{18}H_{32}O_{16}$
Umbelliferose	(Galaktose + Glukose + Fruktose) α, β -1,2-glycosidisch	$C_{18}H_{32}O_{16}$
III. Polysaccharide		
Stärke	(Glukose) α -1,4- ; α -1,6- glycosidisch	$(C_6H_{10}O_5)_n$
Zellulose	(Glukose) β -1,4- glykosidisch	$(C_6H_{10}O_5)_n$
Glykogen	(Glukose) α -1,4- ; α -1,6- glykosidisch	$(C_6H_{10}O_5)_n$
Fruktane	(Fruktose + Glukose) β -2,1- ; β -2,6-glycosidisch; 6G-Kestosen	$(C_6H_{10}O_5)_n$
Amylose	(Glukose) α -1,4-glykosidisch	$(C_6H_{10}O_5)_n$

Anhang

IV. Heteropolysaccharide und Lignin		
Hemizellulosen	(Xylose, Arabinose, Glukose u.a.) amorph	
Pektine	(D-Galacturonsäure, α -L-Rhamnose + Seitenketten) α -1,4-; α -1,2-glycosidisch; amorph	
Lignin	(Cumaryl-, Coniferyl-, Sinapylalkohol) aromatisch, phenolisch, C-C-einfach-, C-C- doppel-Bindung ; amorph	

9.2.2 Material und Methoden

9.2.2.1 Tiere und Substrat

Tab. 2: Daten der Versuchstiere

VERSUCH / TIER	1	2	3
Geburtsjahr	1987	1999	1991
Schlachtgrund	Wirtschaftlichkeit	Podotrochlose	Wirtschaftlichkeit
Fütterung	2 x tgl: 2 kg Hafer 4 kg Heu 1 kg Möhren	Weide, Heu, Hafer, Äpfel, Möhren	Keine Angaben Befunde*: evtl. Pelletts/ Häksel aus Heu; Stroh

* Inspektion des Darminhaltes nach Schlachtung

Tab. 3: Eckdaten von Raftilose – BeneoTM P 95

PARAMETER	GRÖSSENORDNUNG
Trockensubstanz	97 ± 1,5 %
Rohasche	< 0,2 %
Kohlenhydrate	> 99,5 %
Oligofruktose	> 93,2 %
Glukose + Fruktose + Sukrose	< 6,8 %
Polymerisationsgrad	2 - 8
pH-Wert	5,1
Brennwert	6,62 MJ/kg

Anhang

9.2.2.2 Geräte

in-vitro-Fermentations-Apparatur	(Physiologisches Institut, TiHO Hannover, Direktor: Prof. Breves, Germany)
Pumpe	(Watson Marlow GmbH, Mehrkanalpumpe Typ 205 S, Germany)
Redoxelektrode	(MV 88 Präzisions-Labor-pH-Messgerät, VEB Präcitronic Dresden, GBR)
pH-Messgerät	(MV 88 Präzisions-Labor-pH-Messgerät, VEB Präcitronic Dresden, GBR)
Makro N	(Fa. ELEMENTAR ANALYSENSYSTEME GmbH, Hanau, Germany)
Soxhlettapparatur	(Soxtec-Gerät, Fa. FOSS, Rellingen, Germany)
Fibertec Systems	(Hot Extractor 1020 Fa. TECATOR AB, Höganäs, Schweden)
Kühlzentrifuge	(Hettrich Universal 30 RF, Werneck-Zeuzleben, Germany)
Gaschromatograph	(SHIMADZU GC - 14 A, Shimadzu Europa GmbH)
Beutelpresse	(eigene Anfertigung, Leipzig, Germany)
Gasmesszylinder	(eigene Anfertigung, Leipzig, Germany)
Thermobehälter	(eigene Anfertigung, Leipzig, Germany)
HGT-Glaskolben	(häberle Labortechnik, Typ: Fortuna, Germany)
2 Thermoschränke	(Typ 8, VEB MLW medizinische Geräte Berlin, GDR)
2 Thermostate	(Haake Thermo Elektron Corporation, DC 10, Vreden, Germany)
Schüttel	(Heidolph Promax 2020)
Schüttelaufbau	(eigene Anfertigung, Leipzig, Germany)
Schnellkochtopf	(Steinbach, 10 Liter, Germany)
Futtermittelmühle	(Cyclotec 1093 sample mill, tecator)
Waschmaschine	(privileg Öko 1001, KarstadtQuelle AG, Germany)
Trockenschrank	(Typ T 6030; Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf, Germany)
Ultrazentrifuge	(Mikro 12-24 Hettrich)
Pumpe A	(Waters 510 HPLC Pump Millipore)
Pumpe B	(Waters 515 HPLC Pump Millipore (Serial # K99 15 151M))
Degaser	(Waters In-Line-Degaser AF (Serial # K02DG2 351M))
Autosampler	(Waters TM 717 Autosampler Millipore)
Säulenofen	(Knauer, Nr.48073, Berlin, Germany)
Säule	(Alltech Grom GmbH SLI- FMOC- Polyamin 2,5 µm; 250 x 4 mm, Rottenburg-Hailfingen, Germany)
Reinigungsvorsäule	(Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 µm, 125 x 4 mm ID, GR-GSOD22010V0404, Trentec Analysentechnik, Gerlingen, Germany)
Vorsäule	(Reprosil-Pur 120 ODS3, 3 µm, 125 x 4 mm ID, GR-GSPO10510V0104V, Trentec Analysentechnik, Gerlingen, Germany)
Detektor	(Waters470 Scanning Fluorescence Detektor Millipore)
Software	(Waters Chromatographie Division Millenium 2010)

9.2.2.3 Chemikalien

Trockeneis (Linde AG, Pullach, Germany)
Spezialgas CO₂ : N₂ = 40: 60 [v/v] (Linde AG, Pullach, Germany)

Beckmannlösung:
750 ml Alkohol 96%
7,5 ml Schwefelsäure konz.
ad 1 l Aqua dest.

Anhang

Messung der Titrationsazidität:

0,01 molare Salzsäure

Fettsäureanalyse:

Eichlösung (enthält: Essigsäure 100; Propionsäure 60; iso-Buttersäure 10; Buttersäure 40; iso-Valeriansäure 10; Valeriansäure 14; Capronsäure 9 mmol/l)

Innere Standardlösung (enthält: 500 mg iso-Capronsäure (4-Methylvaleriansäure) in 100 ml 70%iger Ameisensäure)

9.2.2.4 Puffer

Pufferlösung HGT: (Hersteller siehe Chemikalien Caesitec)

NaCl

NH₄HCO₃

Na₂HPO₄

KH₂PO₄

MgSO₄ * 7 H₂O

CaCl₂ * 2 H₂O

MnCl₂ * 4 H₂O,

CoCl₂ * 6 H₂O

FeCl₃ * 6 H₂O

Resazurin

NaOH, c = 1 mol/l

Na₂S * 7 H₂O

Pufferlösung Caesitec:

NaCl (VEB – Laborchemie Apolda, DDR)

KCl (VEB – Laborchemie Apolda, DDR)

Na₂SO₄ (ChemaPol, Prag, Tschecheslowakai)

KH₂PO₄ (VEB Jenapharm – Laborchemie Apolda, DDR)

NaH₂PO₄ * 2 H₂O (E. Merck, Darmstadt, Germany)

CaCl₂ * 2 H₂O (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)

MgCl₂ * 6 H₂O (VEB Berlin – Chemie, Berlin, DDR)

Na₂HPO₄ * 2 H₂O (Feinchemie K.-H. Kallies KG, Germany)

NH₂CONH₂ (VEB – Laborchemie Apolda, DDR)

NaHCO₃ (VEB VSW “Karl Marx” Bernburg- Staßfurt, DDR)

NH₄HCO₃ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany)

Anhang

9.2.3 Ergebnisse

Tab. 4: Nährstoffgehalte in Zäkuminhalt nach Weender-Analyse

Rohnährstoffe	in LT (%)			in oS (%)			in T (%)		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
Versuche									
lufttrockene Substanz LT (in der Orig.S.)	8,66	6,60	4,40						
Trockensubstanz TS (in der LT)	93,00	92,41	90,88	8,05	6,10	4,00	100,00	100,00	100,00
Rohasche Ra	11,78	14,50	20,35	1,02	0,96	0,90	12,67	15,69	22,39
Rohprotein Rp	8,99	9,40	7,21	0,78	0,62	0,32	9,67	10,17	7,93
Rohfaser Rfa	30,00	27,86	25,94	2,60	1,84	1,14	32,26	30,15	28,54
Rohfett Rfe	1,87	2,13	1,31	0,16	0,14	0,06	2,04	2,37	1,44
NfE				3,50	2,54	1,59	43,40	41,68	39,69
organische Substanz				7,03	5,14	3,10	87,33	84,31	77,61
Stickstoffgehalt N				0,12	0,10	0,05	1,55	1,63	1,27
NDF	57,40	55,30	49,24	4,97	3,65	2,17	62,71	61,51	54,18
ADF	33,73	31,46	29,70	2,92	2,08	1,31	36,27	34,99	32,68
Zellulose	27,53	26,82	23,95	2,38	1,77	1,05	30,08	29,83	26,35
Lignin	6,20	4,64	5,75	0,54	0,31	0,25	6,77	5,16	6,33
Mineralstoffe									
Calcium Ca	0,17	0,19	0,18	0,01	0,01	0,01	0,18	0,21	0,20
Magnesium Mg	0,10	0,13	0,06	0,01	0,01	0,00	0,11	0,14	0,07
Phosphor P	0,42	0,57	0,65	0,04	0,04	0,03	0,45	0,62	0,72

Anhang

Kalium	K	1,34	1,85	1,35	0,12	0,12	0,06	1,44	2,00	1,49
Natrium	Na	3,11	4,16	7,25	0,27	0,27	0,32	3,34	4,50	7,98
		(mg/kg)								
Zink	Zn	46,80	44,2	32,40	4,05	2,92	1,43	50,32	47,83	35,65
Kupfer	Cu	10,50	15,9	9,48	0,91	1,05	0,42	11,29	17,21	10,43

9.2.3.1 Ergebnisse der Caesitec-Studie

Tab. 5: Vorversuch zur pH-Wert-Veränderung nach Raftilosegabe

Fermenter	1. Konzentratgabe			2. Konzentratgabe			
	0 h ppr.	24 h ppr.	48 h ppr.	72 h/0 h ppr.	3 h ppr.	6 h ppr.	24 h ppr.
Rafti 1 V1	6,73	6,34	6,6	6,63	6,6	5,06	6,15
Rafti 2 V1	6,68	6,37	6,7	6,63	6,8	5,16	6,26

Fermenter	1. Konzentratgabe					
	0 h ppr.	3 h ppr.	6 h ppr.	12 h ppr.	24 h ppr.	
Rafti 3 V2	6,71	6,13	5,04	4,72	6,27	
Rafti 4 V2	6,64	5,73	4,93	4,76	6,26	
Rafti 5 V2	6,63	5,70	4,94	4,77	6,27	
Fermenter	2. Konzentratgabe					
	48 h/0 h ppr.	3 h ppr.	6 h ppr.	12 h ppr.	24 h ppr.	48 h ppr.
Rafti 3 V2	6,74	5,66	5,15	4,97	6,37	6,67
Rafti 4 V2	6,69	5,83	5,14	4,84	6,47	6,71
Rafti 5 V2	6,64	6,05	5,35	5,13	6,30	6,71

Fütterungstag

h ppr. Stunden postprandial

Anhang

Tab. 6: Voruntersuchung zur Optimierung der Zeitintervalle der Raftilosefütterung / Vergleich der Daten an Versuchstag 7 und 8

Parameter	Fermenter	Versuchstag			
		5	6	7	8
Redox	Rafti 1	373	350	367	359
	Rafti 2	366	359	362	364
pH	Rafti 1	6,73	6,34	6,60	6,63
	Rafti 2	6,68	6,37	6,70	6,63
Gasvolumen ml	Rafti 1	530	3730	750	630
	Rafti 2	550	3520	410	740
FFS mmol/l	Rafti 1	27,868	57,189	32,103	33,317
	Rafti 2	21,442	53,035	24,769	28,172
Acetat mmol/l	Rafti 1	15,134	16,726	12,452	16,261
	Rafti 2	10,846	15,103	9,266	12,998
Propionat mmol/l	Rafti 1	6,660	18,226	8,367	9,998
	Rafti 2	5,952	16,535	6,734	8,838
i-Butyrat mmol/l	Rafti 1	0,231	0,087	0,192	0,237
	Rafti 2	0,083	0,096	0,050	0,000
n-Butyrat mmol/l	Rafti 1	3,883	11,048	5,129	3,767
	Rafti 2	3,268	10,741	4,175	3,755

Fütterungstag

Parameter	Fermenter	Versuchstag			
		5	6	7	8
i-Valeriat mmol/l	Rafti 1	0,243	0,067	0,216	0,262
	Rafti 2	0,111	0,095	0,139	0,179
n-Valeriat mmol/l	Rafti 1	1,409	10,367	5,112	2,435
	Rafti 2	1,183	9,832	3,965	2,401
n-Capronat mmol/l	Rafti 1	0,308	0,668	0,632	0,357
	Rafti 2	0,000	0,632	0,440	0,000
Gesamtlaktat mmol/l	Rafti 1	0,011	0,011	0,089	0,044
	Rafti 2	0,000	0,011	0,000	0,033
L-Laktat mmol/l	Rafti 1	0,000	0,000	0,033	0,022
	Rafti 2	0,000	0,000	0,000	0,022
D-Laktat mmol/l	Rafti 1	0,011	0,011	0,056	0,022
	Rafti 2	0,000	0,011	0,000	0,011
NH3 mmol/l	Rafti 1	14,900	9,550	15,770	15,920
	Rafti 2	15,650	10,470	16,320	21,550

Anhang

Tab. 7: Redoxpotential in Fermenterflüssigkeit (- mV) in den einzelnen Versuchs-(Rafti) und Kontrollfermentern (Blind) sowie Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage								
	Einstellphase				Konzentratgabe				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rafti 1 / V1	370	363	372	379	373	350	359	354	k ¹
Rafti 2 / V1	362	358	359	365	366	359	364	355	k ¹
Rafti 3 / V2	367	374	372	370	368	290	374	364	378
Rafti 4 / V2	368	362	364	362	358	321	378	368	368
Rafti 5 / V2	360	355	353	367	359	268	345	359	361
Rafti 6 / V3	389	378	368	384	398	388	422	346	410
Rafti 7 / V3	378	360	358	374	393	375	396	342	395
Rafti 8 / V3	376	359	357	372	391	363	396	350	402
\bar{x}	371	364	363	372	376	339	379	355	386
$\pm s$	9,5	8,1	7,2	7,3	16,0	42,4	24,6	8,8	19,6

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	362	354	361	370	368	364	340	k ¹	k ¹
Blind 2	365	359	364	364	365	292	370	340	358
Blind 3	356	354	368	379	370	365	378	369	365
\bar{x}	361 a	355 a	364 a	371 a	367 a	340 a	362 a	(355 a)	(361 a)
$\pm s$	4,6	2,9	3,5	7,5	2,5	41,9	20,0	20,5	4,9

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Stichprobenanzahl

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 8: pH- Wert in Fermenterflüssigkeit inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	Einstellphase				Konzentratgabe						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	6,58	6,64	6,69	6,69	6,73	k ¹	6,34	6,63	k ¹	6,15	k ¹
Rafti 2 / V1	6,58	6,59	6,59	6,68	6,68	k ¹	6,37	6,63	k ¹	6,26	k ¹
Rafti 3 / V2	6,57	6,68	6,67	6,74	6,71	4,72	6,27	6,74	4,97	6,37	6,37
Rafti 4 / V2	6,59	6,70	6,69	6,71	6,64	4,76	6,26	6,69	4,84	6,47	6,47
Rafti 5 / V2	6,57	6,67	6,66	6,75	6,63	4,77	6,27	6,64	5,13	6,30	6,30
Rafti 6 / V3	6,99	6,70	7,00	7,04	7,06	5,38	6,55	7,21	4,79	5,84	6,74
Rafti 7 / V3	6,92	6,62	6,90	6,92	7,04	5,36	6,46	7,06	4,85	6,20	6,76
Rafti 8 / V3	6,96	6,65	6,93	6,89	7,05	5,36	6,40	7,05	4,72	6,19	6,82
\bar{x}	6,72	6,66	6,77	6,80	6,82	5,06	6,37	6,83	4,88	6,22	6,58
$\pm s$	0,197	0,039	0,152	0,131	0,195	0,338	0,103	0,236	0,146	0,187	0,224

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	6,57	6,65	6,62	6,68	6,71	k ¹	6,70	6,67	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	6,58	6,74	6,71	6,72	6,64	k ¹	6,64	6,70	k ¹	6,77	6,66
Blind 3	6,70	6,67	6,84	6,83	6,74	6,77	6,81	6,89	6,80	6,78	6,86
\bar{x}	6,62 a	6,69 a	6,72 a	6,74 a	6,70 a		6,72 a	6,75 a		(6,78 a)	(6,76 a)
$\pm s$	0,007	0,064	0,064	0,025	0,049		0,042	0,021			

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 9: Gesamtlaktat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	Einstellphase				Konzentratgabe						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	0,037	0,019	0,016	0,012	0,016	k ¹	0,023	0,019	k ¹	0,037	k ¹
Rafti 2 / V1	0,044	0,044	0,016	0,005	0,012	k ¹	0,004	0,411	k ¹	0,021	k ¹
Rafti 3 / V2	0,044	0,044	0,044	0,089	0,033	60,946	6,372	0,044	9,136	0,044	0,044
Rafti 4 / V2	0,067	0,033	0,044	0,033	0,033	65,653	8,892	0,044	9,442	0,056	0,056
Rafti 5 / V2	0,067	0,033	0,033	0,056	0,033	63,000	7,971	0,056	8,857	0,044	0,033
Rafti 6 / V3	0,073	0,105	0,034	0,027	0,038	45,559	38,866	0,000	64,311	50,619	3,495
Rafti 7 / V3	0,205	0,087	0,091	0,055	0,038	46,033	39,499	0,014	55,230	35,739	0,086
Rafti 8 / V3	0,109	0,073	0,052	0,041	0,030	45,770	42,611	0,053	53,101	33,240	0,039
\bar{x}	0,081	0,055	0,041	0,040	0,029	54,493	18,030	0,080	33,346	14,975	0,626
$\pm s$	0,0551	0,0302	0,0240	0,0270	0,0098	9,6542	18,7811	0,1351	26,7780	21,2148	1,4058

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	0,040	0,030	0,012	0,008	0,019	k ¹	0,008	0,012	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	0,056	0,056	0,056	0,033	0,033	k ¹	0,044	0,044	k ¹	0,033	0,033
Blind 3	0,033	0,033	0,033	0,011	0,022	0,036	0,044	0,022	0,033	0,011	0,022
\bar{x}	0,043 a	0,040 a	0,034 a	0,018 a	0,025 a	0,036	0,032 a	0,026 a	0,033	(0,022 a)	(0,028 a)
$\pm s$	0,0113	0,0139	0,0218	0,0137	0,0075		0,0208	0,0166		0,0157	0,0078

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

0,000 unterhalb Nachweisgrenze

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 10 : L-Laktat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage											
	Einstellphase				Konzentratgabe							
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9	
Rafti 1 / V1	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	k ¹	0,000	0,014	k ¹	0,032	k ¹	
Rafti 2 / V1	0,025	0,022	0,000	0,000	0,000	k ¹	0,004	0,322	k ¹	0,021	k ¹	
Rafti 3 / V2	0,044	0,033	0,033	0,089	0,033	47,269	4,296	0,044	7,519	0,044	0,044	
Rafti 4 / V2	0,033	0,022	0,022	0,033	0,033	51,188	6,916	0,044	8,223	0,056	0,056	
Rafti 5 / V2	0,022	0,033	0,033	0,056	0,033	50,255	5,817	0,056	6,552	0,044	0,033	
Rafti 6 / V3	0,044	0,059	0,020	0,016	0,020	41,940	30,615	0,000	50,355	36,448	2,431	
Rafti 7 / V3	0,162	0,052	0,069	0,023	0,020	43,132	32,109	0,012	38,440	23,003	0,012	
Rafti 8 / V3	0,073	0,041	0,041	0,020	0,016	42,367	33,105	0,044	35,737	21,616	0,027	
\bar{x}	0,052	0,033	0,027	0,030	0,019	46,025	14,108	0,067	24,471	10,158	0,434	
$\pm s$	0,0478	0,0185	0,0227	0,0299	0,0139	4,1117	14,9861	0,1048	19,3106	14,6355	0,9785	

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	0,021	0,014	0,000	0,000	0,000	k ¹	0,000	0,011	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	0,033	0,044	0,022	0,033	0,033	k ¹	0,044	0,044	k ¹	0,033	0,033
Blind 3	0,011	0,011	0,022	0,011	0,022	0,024	0,033	0,011	0,012	0,011	0,000
\bar{x}	0,022 a	0,023 a	0,015 a	0,015 a	0,019 a	0,024	0,026 a	0,022 a	0,012	(0,022 a)	(0,017 a)
$\pm s$	0,0111	0,0184	0,0128	0,0170	0,0170		0,0231	0,0194		0,0157	0,0235

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

0,000 unterhalb Nachweisgrenze

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 11: D- Laktat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	Einstellphase				Konzentratgabe						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	0,023	0,019	0,016	0,012	0,016	k ¹	0,023	0,005	k ¹	0,005	k ¹
Rafti 2 / V1	0,019	0,022	0,016	0,005	0,012	k ¹	0,000	0,089	k ¹	0,000	k ¹
Rafti 3 / V2	0,000	0,011	0,011	0,000	0,000	13,677	2,076	0,000	1,616	0,000	0,000
Rafti 4 / V2	0,033	0,011	0,022	0,000	0,000	14,465	1,976	0,000	1,218	0,000	0,000
Rafti 5 / V2	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	12,744	2,154	0,000	2,305	0,000	0,000
Rafti 6 / V3	0,029	0,047	0,014	0,011	0,018	3,618	8,251	0,000	13,956	14,171	1,064
Rafti 7 / V3	0,043	0,036	0,022	0,032	0,018	2,901	7,390	0,002	16,790	12,736	0,074
Rafti 8 / V3	0,036	0,032	0,011	0,022	0,014	3,403	9,507	0,009	17,364	11,624	0,013
\bar{x}	0,028	0,022	0,014	0,010	0,010	8,468	3,922	0,013	8,875	4,817	0,192
$\pm s$	0,0145	0,0153	0,0070	0,0117	0,0083	5,6841	3,8334	0,0308	7,9374	6,6816	0,4282

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	0,019	0,016	0,012	0,008	0,019	k ¹	0,008	0,001	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	0,022	0,011	0,033	0,000	0,000	k ¹	0,000	0,000	k ¹	0,000	0,000
Blind 3	0,022	0,022	0,011	0,000	0,000	0,012	0,011	0,011	0,022	0,000	0,022
\bar{x}	0,021 a	0,016 a	0,019 a	0,003 a	0,006 a	0,012	0,006 a	0,004 a	0,022	(0,000 a)	(0,011 a)
$\pm s$	0,0018	0,0056	0,0126	0,0048	0,0110		0,0058	0,0061		0,0000	0,0157

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

0,000 unterhalb Nachweisgrenze

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 12: Gemessenes Gasvolumen der Caesitec-Gasbeutel (ml) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	Einstellphase				Konzentratgabe						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	540	500	350	480	530	k ¹	3730	630	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 2 / V1	630	390	520	280	550	k ¹	3520	740	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 3 / V2	970	440	480	520	480	k ¹	3197	407	k ¹	4147	567
Rafti 4 / V2	740	360	480	460	770	k ¹	3057	697	k ¹	3817	507
Rafti 5 / V2	900	430	600	280	960	k ¹	3147	597	k ¹	3252	487
Rafti 6 / V3	336	256	256	306	256	k ¹	1966	276	k ¹	2026	546
Rafti 7 / V3	416	266	316	426	386	k ¹	2016	506	k ¹	1616	476
Rafti 8 / V3	336	66	76	306	236	k ¹	1446	486	k ¹	2276	376
\bar{x}	609	339	385	382	521		2760	542		2856	493
$\pm s$	246	138	169	99	247		833	155		1031	67

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	620	310	410	390	500	k ¹	340	630	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	600	240	480	460	760	k ¹	784	734	k ¹	364	904
Blind 3	550	490	220	320	590	k ¹	667	326	k ¹	480	346
\bar{x}	590 a	347 a	370 a	390 a	617 a		597 a	563 a		(422 a)	(625 a)
$\pm s$	36,1	129,0	134,5	70,0	132,0		230,1	212,0		82,0	394,6

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

0,000 unterhalb Nachweisgrenze

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 13: Wasserstoff im produzierten Gas ($\mu\text{mol/l}$) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	56,24	k ¹	45,96	204,14	12,82	k ¹	66,17	38,79	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 2 / V1	41,60	k ¹	18,90	0,00	23,70	k ¹	11,44	53,38	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 3 / V2	0,00	0,00	62,64	18,25	55,28	k ¹	3374,48	3918,16	k ¹	1378,21	904,12
Rafti 4 / V2	0,00	55,20	0,00	188,12	88,98	k ¹	3936,43	8753,84	k ¹	686,89	268,90
Rafti 5 / V2	31,79	92,83	0,00	0,00	21,64	k ¹	120,24	8404,65	k ¹	2351,92	166,80
Rafti 6 / V3	0,00	37,42	338,99	0,00	0,00	k ¹	24,60	0,00	k ¹	339,11	83,11
Rafti 7 / V3	15,62	59,32	329,22	105,39	37,43	k ¹	0,00	307,06	k ¹	1694,55	567,37
Rafti 8 / V3	0,00	810,72	127,57	473,65	0,00	k ¹	105,48	66,31	k ¹	0,00	277,00
\bar{x}	18,16	175,91	115,41	123,69	29,98		954,86	2692,77		1075,11	377,89
$\pm s$	22,396	312,466	141,124	164,945	30,184	1674,144	1674,144	3867,717	305,397	889,282	305,397

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	k ¹	k ¹	65,70	104,07	43,76	k ¹	23,91	40,24	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	0,00	70,73	0,00	164,32	98,53	k ¹	31,61	26,54	k ¹	0,00	31,69
Blind 3	17,56	87,56	13,90	196,27	17,00	k ¹	5,72	0,00	k ¹	51,52	47,51
\bar{x}	(8,78 a)	(79,14 ab)	26,53 ab	154,89 b	53,10 ab		20,41 ab	22,26 ab		(25,76 ab)	(39,60 ab)
$\pm s$	12,418	11,904	34,625	46,818	41,559		13,296	20,459		36,428	11,186

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

0,000 unterhalb Nachweisgrenze

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 14: Methan im produzierten Gas ($\mu\text{mol/l}$) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	Einstellphase				Konzentratgabe						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	481,98	k ¹	826,11	1178,64	1138,96	k ¹	1031,79	1563,21	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 2 / V1	557,35	k ¹	106,93	0,00	3776,39	k ¹	1145,35	2684,05	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 3 / V2	17,36	0,00	2228,44	51,49	8187,03	k ¹	396,75	5643,76	k ¹	943,49	3671,68
Rafti 4 / V2	0,00	1512,90	151,02	3175,12	4504,65	k ¹	474,05	771,98	k ¹	716,07	4921,49
Rafti 5 / V2	1335,96	0,00	0,00	1692,65	3601,90	k ¹	404,06	2213,62	k ¹	517,15	2466,28
Rafti 6 / V3	378,50	78,32	983,69	0,00	4883,03	k ¹	108,49	0,00	k ¹	0,00	935,15
Rafti 7 / V3	36,72	0,00	455,95	584,87	917,94	k ¹	0,00	67,02	k ¹	6268,47	63,17
Rafti 8 / V3	0,00	812,35	718,58	473,26	203,82	k ¹	35,56	0,00	k ¹	0,00	98,66
\bar{x}	350,98	400,59	683,84	894,50	3401,71		449,51	1617,95		1407,53	2026,07
$\pm s$	460,918	631,196	720,461	1102,156	2618,784	433,988	433,988	1929,401	2002,163	2411,522	2002,163

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	k ¹	k ¹	0,00	1095,47	4384,84	k ¹	6975,05	4015,39	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	0,00	1326,00	0,00	3537,38	4211,00	k ¹	6888,58	6191,82	k ¹	5767,88	5987,26
Blind 3	397,67	377,19	12,90	459,13	616,05	k ¹	227,51	0,00	k ¹	2119,32	1653,03
\bar{x}	(198,84a)	(851,59a)	4,30 a	1697,33ab	3070,63ab		4697,05ab	3402,40ab		(3943,60ab)	(3820,14ab)
$\pm s$	281,198	670,911	7,446	1624,986	2127,504		3870,977	3141,095		2579,922	3064,765

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

0,000 unterhalb Nachweisgrenze

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 15: Wasserstoff-Methan-Quotient (H₂:CH₄) inkl. Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	0,12	k ¹	0,06	0,17	0,01	k ¹	0,06	0,02	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 2 / V1	0,07	k ¹	0,18	k ²	0,01	k ¹	0,01	0,02	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 3 / V2	0,00	k ²	0,03	0,35	0,01	k ¹	8,51	0,69	k ¹	1,46	0,25
Rafti 4 / V2	k ²	0,04	0,00	0,06	0,02	k ¹	8,30	11,34	k ¹	0,96	0,05
Rafti 5 / V2	0,02	k ²	k ²	0,00	0,01	k ¹	0,30	3,80	k ¹	4,55	0,07
Rafti 6 / V3	0,00	0,48	0,34	k ²	0,00	k ¹	0,23	k ²	k ¹	k ²	0,09
Rafti 7 / V3	0,43	k ²	0,72	0,18	0,04	k ¹	k ²	4,58	k ¹	0,27	8,98
Rafti 8 / V3	k ²	1,00	0,18	1,00	0,00	k ¹	2,97	k ²	k ¹	k ²	2,81
\bar{x}	0,11	0,50	0,21	0,29	0,01		2,91	3,41		1,81	2,04
$\pm s$	<i>0,163</i>	<i>0,481</i>	<i>0,253</i>	<i>0,367</i>	<i>0,013</i>		<i>3,893</i>	<i>4,353</i>		<i>1,890</i>	<i>3,568</i>

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	k ¹	k ¹	k ²	0,10	0,01	k ¹	0,00	0,01	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	k ²	0,05	k ²	0,05	0,02	k ¹	0,00	0,00	k ¹	0,00	0,01
Blind 3	0,04	0,23	1,08	0,43	0,03	k ¹	0,03	k ²	k ¹	0,02	0,03
\bar{x}	(0,04 a)	(0,14 a)	(1,08 a)	0,19 a	0,02 a		0,01 a	(0,01 a)		(0,01 a)	(0,02 a)
$\pm s$	k ²	<i>0,126</i>	k ²	<i>0,207</i>	<i>0,009</i>		<i>0,012</i>	<i>0,004</i>		<i>0,017</i>	<i>0,017</i>

k¹ Keine Datenerhebung bzw. technischer Fehler, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

k² mathematischer Fehler: Division durch 0,00; nicht in MW-Berechnung eingeflossen

0,00 unterhalb Nachweisgrenze

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 16: Kurzkettige Fettsäuren in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage											
	Einstellphase				Konzentratgabe							
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9	
Rafti 1 / V1	44,538	29,420	22,849	19,204	27,868	k1	57,189	33,317	k1	73,233	k1	
Rafti 2 / V1	53,009	34,345	34,772	18,078	21,442	k1	53,035	28,172	k1	63,847	k1	
Rafti 3 / V2	47,751	39,466	30,496	27,322	24,414	27,922	51,264	26,396	64,844	56,502	28,424	
Rafti 4 / V2	66,021	35,947	29,167	23,637	25,674	22,849	38,530	43,581	52,577	55,896	28,249	
Rafti 5 / V2	53,634	31,776	31,646	19,487	27,878	22,052	42,164	30,280	63,868	54,610	28,250	
Rafti 6 / V3	32,474	91,905	37,565	26,439	17,839	15,868	18,402	27,937	21,303	15,467	23,661	
Rafti 7 / V3	35,052	74,549	34,071	30,014	22,529	20,448	20,533	23,012	12,720	13,604	24,901	
Rafti 8 / V3	37,043	6,783	34,161	29,970	22,312	19,825	22,657	25,878	21,876	21,046	21,908	
\bar{x}	46,190	43,024	31,841	24,269	23,745	21,494	37,972	29,822	39,531	44,276	25,899	
$\pm s$	11,3150	27,1142	4,4970	4,8812	3,4219	3,9749	15,6406	6,3435	23,5203	23,6739	2,8056	

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	50,653	32,110	26,474	17,074	19,592	k ¹	6,000	22,918	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	53,277	29,602	26,053	23,716	27,666	k ¹	29,684	29,801	k ¹	30,011	30,276
Blind 3	46,052	36,593	23,788	31,484	28,997	31,468	34,086	30,999	30,241	37,356	38,111
\bar{x}	49,994a	32,768ab	25,438b	24,091b	25,418b	31,468	23,257b	27,906ab	30,241	(33,684ab)	(34,194ab)
$\pm s$	3,6573	3,5417	1,4446	7,2123	5,0895		15,1059	4,3611		5,1937	5,5402

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 17: Azetat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	26,940	16,766	12,371	10,066	15,134	k ¹	16,726	16,261	k ¹	23,226	k ¹
Rafti 2 / V1	34,002	19,568	19,326	9,884	10,846	k ¹	15,103	12,998	k ¹	20,737	k ¹
Rafti 3 / V2	29,768	23,412	16,745	16,612	15,721	14,657	11,405	9,795	10,866	10,586	9,679
Rafti 4 / V2	38,681	20,610	15,629	13,810	15,299	11,363	7,271	17,823	7,745	10,714	9,494
Rafti 5 / V2	33,580	17,760	16,853	11,575	16,500	10,147	7,585	11,376	9,095	11,071	10,049
Rafti 6 / V3	20,367	51,217	20,571	15,434	10,944	9,82	12,516	20,699	14,514	11,276	11,442
Rafti 7 / V3	22,316	41,968	18,529	17,028	14,523	14,078	12,41	9,973	5,919	3,168	10,331
Rafti 8 / V3	23,587	0,082	18,871	17,2	14,254	13,214	11,831	9,842	5,729	4,29	7,737
\bar{x}	28,655	23,923	17,362	13,951	14,153	12,213	11,856	13,596	8,978	11,884	9,789
$\pm s$	6,4598	15,8492	2,5731	3,0846	2,1255	2,0577	3,2617	4,1812	3,3364	7,0177	1,2168

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	32,506	18,625	13,999	8,733	9,041	k ¹	9,691	11,921	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	33,547	16,948	14,048	14,411	17,267	k ¹	18,921	17,316	k ¹	16,502	18,035
Blind 3	29,426	21,281	13,630	16,854	15,804	16,783	18,913	16,808	15,35	18,185	17,867
\bar{x}	31,826 a	18,951 b	13,892 b	13,333 b	14,037 b	16,783	15,842 b	15,348 b	15,350	(17,344b)	(17,951b)
$\pm s$	2,1429	2,1849	0,2285	4,1665	4,3883		5,3266	2,9790		1,1901	0,1188

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 18: Propionat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	12,963	9,225	7,019	5,302	6,660	k ¹	18,226	8,367	k ¹	25,940	k ¹
Rafti 2 / V1	13,877	11,373	10,650	5,577	5,952	k ¹	16,535	6,734	k ¹	19,970	k ¹
Rafti 3 / V2	11,790	12,183	10,606	7,195	5,864	8,417	20,290	7,900	18,065	13,694	6,387
Rafti 4 / V2	17,068	11,622	10,395	6,336	7,144	6,176	13,030	11,758	13,012	11,682	5,240
Rafti 5 / V2	13,136	10,515	11,511	5,944	7,662	5,420	14,059	8,826	16,573	11,774	6,356
Rafti 6 / V3	8,572	31,444	13,915	9,003	4,786	3,958	2,610	2,919	2,359	0,000	2,713
Rafti 7 / V3	9,680	26,955	13,297	11,101	6,356	4,346	2,661	1,667	0,000	1,316	5,354
Rafti 8 / V3	9,990	0,000	12,476	10,711	6,248	4,490	3,417	3,484	0,000	2,205	1,678
\bar{x}	12,135	14,165	11,234	7,646	6,334	5,468	11,354	6,457	8,335	10,823	4,621
$\pm s$	2,7386	10,1328	2,1470	2,3227	0,8699	1,6550	7,3588	3,7141	8,4743	9,2880	1,9673

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	13,348	10,072	8,257	4,612	4,717	k ¹	5,049	6,361	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	13,170	9,429	9,169	5,907	6,797	k ¹	6,611	7,354	k ¹	6,503	6,459
Blind 3	12,158	11,611	7,693	10,265	9,773	11,635	11,894	9,922	11,264	14,208	14,025
\bar{x}	12,892 a	10,371 a	8,373 a	6,928 a	7,096 a	11,635	7,851 a	7,879 a	11,264	10,356 a	10,242 a
$\pm s$	0,6419	1,1212	0,7448	2,9616	2,5412		3,5871	1,8376		5,4483	5,3500

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 19: Iso-Butyrat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	0,274	0,232	0,177	0,114	0,231	k ¹	0,087	0,237	k ¹	0,114	k ¹
Rafti 2 / V1	0,314	0,248	0,257	0,094	0,083	k ¹	0,096	0,000	k ¹	0,119	k ¹
Rafti 3 / V2	0,493	0,000	0,244	0,221	0,159	0,194	0,219	0,048	0,095	0,000	0,180
Rafti 4 / V2	0,000	0,333	0,208	0,191	0,000	0,133	0,079	0,361	0,061	0,017	0,056
Rafti 5 / V2	0,000	0,000	0,266	0,000	0,170	0,450	0,000	0,000	0,053	0,112	0,029
Rafti 6 / V3	0,000	0,000	0,000	0,088	0,000	0,329	0,000	0,044	0,071	0,188	0,106
Rafti 7 / V3	0,242	0,000	0,000	0,110	0,000	0,314	0,070	0,037	0,121	0,158	0,108
Rafti 8 / V3	0,000	0,656	0,000	0,127	0,000	0,299	0,093	0,078	0,101	0,199	0,092
\bar{x}	0,165	0,184	0,144	0,118	0,080	0,287	0,081	0,101	0,084	0,113	0,095
$\pm s$	<i>0,1914</i>	<i>0,2351</i>	<i>0,1225</i>	<i>0,0671</i>	<i>0,0947</i>	<i>0,1110</i>	<i>0,0683</i>	<i>0,1294</i>	<i>0,0262</i>	<i>0,0728</i>	<i>0,0518</i>

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	0,325	0,184	0,172	0,118	0,051	k ¹	0,023	0,086	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	0,000	0,278	0,210	0,214	0,000	k ¹	0,192	0,000	k ¹	0,148	0,085
Blind 3	0,253	0,000	0,000	0,101	0,107	0,000	0,106	0,069	0,000	0,089	0,108
\bar{x}	0,193 a	0,154 a	0,127 a	0,144 a	0,053 a	0,000	0,107 a	0,052 a	0,000	0,119 a	0,097 a
$\pm s$	<i>0,1707</i>	<i>0,1414</i>	<i>0,1119</i>	<i>0,0609</i>	<i>0,0535</i>		<i>0,0845</i>	<i>0,0455</i>		<i>0,0417</i>	<i>0,0163</i>

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit
 ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 20: N-Butyrat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	3,607	2,447	2,376	2,657	3,883	k ¹	11,048	3,767	k ¹	12,474	k ¹
Rafti 2 / V1	3,899	2,499	3,281	1,854	3,268	k ¹	10,741	3,755	k ¹	11,485	k ¹
Rafti 3 / V2	4,716	3,074	2,300	2,524	2,136	3,711	17,091	5,606	26,710	21,216	6,767
Rafti 4 / V2	7,821	2,705	2,192	2,310	2,435	4,102	15,976	9,215	25,278	22,414	6,966
Rafti 5 / V2	5,636	2,789	2,323	1,506	2,512	4,877	17,622	6,437	30,102	21,906	7,190
Rafti 6 / V3	2,340	6,995	2,419	1,603	1,944	1,366	2,672	2,826	2,396	2,146	2,730
Rafti 7 / V3	2,241	4,464	1,959	1,397	1,324	1,271	5,337	6,537	6,664	6,010	5,528
Rafti 8 / V3	2,693	4,737	2,163	1,748	1,569	1,398	7,154	8,689	10,385	9,069	6,018
\bar{x}	4,119	3,714	2,377	1,950	2,384	2,788	10,955	5,854	16,923	13,340	5,867
$\pm s$	<i>1,9048</i>	<i>1,5919</i>	<i>0,3933</i>	<i>0,4829</i>	<i>0,8528</i>	<i>1,6247</i>	<i>5,6313</i>	<i>2,3340</i>	<i>11,8178</i>	<i>7,7387</i>	<i>1,6581</i>

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	3,669	2,549	2,913	2,530	3,896	k ¹	2,402	2,993	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	5,355	2,397	2,003	2,148	2,529	k ¹	2,790	3,081	k ¹	3,823	3,214
Blind 3	3,573	2,992	1,896	3,073	2,507	2,463	2,542	3,230	2,738	3,379	3,492
\bar{x}	4,199 a	2,646 a	2,271 a	2,584 a	2,977 a	2,463	2,578 a	3,101 a	2,738	(3,601 a)	(3,353 a)
$\pm s$	<i>1,0023</i>	<i>0,3091</i>	<i>0,5588</i>	<i>0,4648</i>	<i>0,7957</i>		<i>0,1965</i>	<i>0,1198</i>		<i>0,3140</i>	<i>0,1966</i>

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 21: Iso-Valeriat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	0,524	0,307	0,191	0,129	0,243	k ¹	0,067	0,262	k ¹	0,119	k ¹
Rafti 2 / V1	0,543	0,323	0,323	0,119	0,111	k ¹	0,095	0,179	k ¹	0,110	k ¹
Rafti 3 / V2	0,631	0,472	0,319	0,259	0,227	0,181	0,086	0,086	0,102	0,072	0,000
Rafti 4 / V2	1,258	0,377	0,281	0,245	0,000	0,192	0,079	0,402	0,077	0,138	0,000
Rafti 5 / V2	0,815	0,418	0,347	0,156	0,217	0,000	0,070	0,095	0,096	0,204	0,000
Rafti 6 / V3	0,521	1,130	0,383	0,149	0,081	0,077	0,000	0,028	0,000	0,015	0,043
Rafti 7 / V3	0,397	0,703	0,000	0,208	0,158	0,167	0,019	0,038	0,017	0,015	0,019
Rafti 8 / V3	0,520	0,749	0,304	0,000	0,000	0,161	0,000	0,000	0,000	0,044	0,033
\bar{x}	0,651	0,560	0,269	0,158	0,130	0,130	0,052	0,136	0,049	0,090	0,016
$\pm s$	<i>0,2731</i>	<i>0,2835</i>	<i>0,1221</i>	<i>0,0825</i>	<i>0,0979</i>	<i>0,0755</i>	<i>0,0392</i>	<i>0,1375</i>	<i>0,0482</i>	<i>0,0657</i>	<i>0,0189</i>

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	0,507	0,268	0,202	0,123	0,097	k ¹	0,069	0,095	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	0,731	0,313	0,229	0,240	0,014	k ¹	0,000	0,242	k ¹	0,255	0,158
Blind 3	0,329	0,224	0,167	0,140	0,113	0,090	0,129	0,085	0,000	0,119	0,147
\bar{x}	0,522 c	0,268 b	0,199 ab	0,168ab	0,075 a	0,090	0,066 a	0,141	0,000	(0,187ab)	(0,153ab)
$\pm s$	<i>0,2014</i>	<i>0,0445</i>	<i>0,0311</i>	<i>0,0632</i>	<i>0,0531</i>		<i>0,0646</i>	<i>0,0879</i>		<i>0,0962</i>	<i>0,0078</i>

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit
 ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte (p < 0,05) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 22: N-Valeriat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	0,230	0,419	0,716	0,937	1,409	k ¹	10,367	2,435	k ¹	10,462	k ¹
Rafti 2 / V1	0,357	0,334	0,784	0,518	1,183	k ¹	9,832	2,401	k ¹	10,435	k ¹
Rafti 3 / V2	0,354	0,325	0,283	0,511	0,306	0,537	1,406	1,615	4,336	4,633	2,164
Rafti 4 / V2	1,191	0,301	0,396	0,603	0,589	0,626	1,184	2,086	2,886	4,167	2,255
Rafti 5 / V2	0,451	0,294	0,335	0,308	0,817	0,834	1,564	1,767	3,629	3,890	1,796
Rafti 6 / V3	0,311	1,119	0,276	0,162	0,067	0,199	0,269	0,448	0,847	0,672	1,740
Rafti 7 / V3	0,175	0,432	0,286	0,169	0,168	0,224	0,022	1,067	0,000	0,661	1,240
Rafti 8 / V3	0,253	0,537	0,345	0,161	0,176	0,203	0,128	1,115	2,046	1,588	1,314
\bar{x}	0,415	0,470	0,428	0,421	0,589	0,437	3,097	1,617	2,291	4,564	1,752
$\pm s$	<i>0,3250</i>	<i>0,2748</i>	<i>0,2037</i>	<i>0,2746</i>	<i>0,5039</i>	<i>0,2684</i>	<i>4,3646</i>	<i>0,7018</i>	<i>1,6565</i>	<i>3,9480</i>	<i>0,4192</i>

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	0,275	0,380	0,848	0,887	1,640	k ¹	1,002	1,290	k ¹	9,616	16,600
Blind 2	0,474	0,221	0,320	0,618	0,718	k ¹	0,848	1,238	k ¹	1,754	1,411
Blind 3	0,275	0,459	0,403	0,970	0,647	0,460	0,471	0,798	0,839	1,267	2,314
\bar{x}	0,341 a	0,353 a	0,524 a	0,825 a	1,002 a	0,460	0,774 a	1,109 a	0,839	1,511 a	1,863 a
$\pm s$	<i>0,1149</i>	<i>0,1212</i>	<i>0,2839</i>	<i>0,1840</i>	<i>0,5540</i>		<i>0,2732</i>	<i>0,2703</i>		<i>0,3444</i>	<i>0,6385</i>

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit
 ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 23: N-Capronat in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage											
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>							
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9	
Rafti 1 / V1	0,000	0,024	0,000	0,000	0,308	k ¹	0,668	0,357	k ¹	0,898	k ¹	
Rafti 2 / V1	0,017	0,000	0,150	0,031	0,000	k ¹	0,632	0,000	k ¹	0,990	k ¹	
Rafti 3 / V2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,225	0,767	1,347	4,669	6,301	3,247	
Rafti 4 / V2	0,000	0,000	0,066	0,142	0,207	0,257	0,912	1,935	3,518	6,765	4,238	
Rafti 5 / V2	0,016	0,000	0,012	0,000	0,000	0,325	1,264	1,778	4,321	5,653	2,829	
Rafti 6 / V3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,119	0,335	0,973	1,118	1,240	4,887	
Rafti 7 / V3	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,048	0,013	3,692	0,000	2,276	2,322	
Rafti 8 / V3	0,000	0,022	0,000	0,024	0,064	0,060	0,035	2,670	3,616	3,652	5,036	
\bar{x}	0,004	0,009	0,029	0,025	0,075	0,172	0,578	1,594	2,874	3,472	3,760	
$\pm s$	<i>0,0076</i>	<i>0,0125</i>	<i>0,0541</i>	<i>0,0491</i>	<i>0,1181</i>	<i>0,1133</i>	<i>0,4313</i>	<i>1,2087</i>	<i>1,8775</i>	<i>2,4737</i>	<i>1,1247</i>	

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	0,024	0,031	0,081	0,070	0,150	k ¹	0,111	0,173	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	0,000	0,016	0,075	0,179	0,340	k ¹	0,323	0,568	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 3	0,037	0,026	0,000	0,080	0,045	0,037	0,031	0,087	0,050	0,108	0,158
\bar{x}	0,020 a	0,024 a	0,052 a	0,110 a	0,178 a	0,037	0,155 a	0,276 ab	0,050	(0,568b)	(0,536ab)
$\pm s$	<i>0,0188</i>	<i>0,0076</i>	<i>0,0451</i>	<i>0,0603</i>	<i>0,1495</i>		<i>0,1509</i>	<i>0,2565</i>		<i>0,6498</i>	<i>0,5346</i>

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit
 ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 24: Azetat-Propionat-Quotient (A:P) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	Einstellphase				Konzentratgabe						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	2,078	1,817	1,763	1,899	2,272	k ¹	0,918	1,626	k ¹	0,895	k ¹
Rafti 2 / V1	2,450	1,721	1,815	1,772	1,822	k ¹	0,913	1,471	k ¹	1,038	k ¹
Rafti 3 / V2	2,525	1,922	1,579	2,309	2,681	1,741	0,562	1,240	0,601	0,773	1,515
Rafti 4 / V2	2,266	1,773	1,504	2,180	2,142	1,840	0,558	1,516	0,595	0,917	1,812
Rafti 5 / V2	2,556	1,689	1,464	1,947	2,153	1,872	0,540	1,289	0,549	0,940	1,581
Rafti 6 / V3	2,376	1,629	1,478	1,714	2,287	2,481	4,795	7,091	6,153	k ²	4,217
Rafti 7 / V3	2,305	1,557	1,393	1,534	2,285	3,239	4,664	5,983	k ²	2,407	1,930
Rafti 8 / V3	2,361	k ²	1,513	1,606	2,281	2,943	3,462	2,825	k ²	1,946	4,611
\bar{x}	2,365	k ²	1,563	1,870	2,240	2,353	2,052	2,880	k ²	k ²	2,611
$\pm s$	0,1536	0,1213	0,1489	0,2704	0,2370	0,6354	1,9146	2,3300	2,7855	0,6356	1,4103

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	2,435	1,849	1,695	1,894	1,917	k ¹	1,919	1,874	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	2,547	1,797	1,532	2,440	2,540	k ¹	2,862	2,355	k ¹	2,538	2,792
Blind 3	2,420	1,833	1,772	1,642	1,617	1,442	1,590	1,694	1,363	1,280	1,274
\bar{x}	2,468 a	1,826 a	1,666 a	1,992 a	2,025 a	1,442	2,124 a	1,974 a	1,363	(1,909a)	(2,033a)
$\pm s$	0,0694	0,0265	0,1224	0,4078	0,4710		0,6602	0,3415		0,8893	1,0736

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

k² mathematischer Fehler: Division durch 0

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 25: Summe der Iso-Fettsäuren (SIS) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	0,798	0,539	0,368	0,243	0,474	k ¹	0,154	0,499	k ¹	0,233	k ¹
Rafti 2 / V1	0,857	0,571	0,580	0,213	0,194	k ¹	0,191	0,179	k ¹	0,229	k ¹
Rafti 3 / V2	1,124	0,472	0,563	0,480	0,386	0,375	0,305	0,134	0,197	0,072	0,180
Rafti 4 / V2	1,258	0,710	0,489	0,436	0,000	0,325	0,158	0,763	0,138	0,155	0,056
Rafti 5 / V2	0,815	0,418	0,613	0,156	0,387	0,450	0,070	0,095	0,149	0,316	0,029
Rafti 6 / V3	0,521	1,130	0,383	0,237	0,081	0,406	0,000	0,072	0,071	0,203	0,149
Rafti 7 / V3	0,639	0,703	0,000	0,318	0,158	0,481	0,089	0,075	0,138	0,173	0,127
Rafti 8 / V3	0,520	1,405	0,304	0,127	0,000	0,460	0,093	0,078	0,101	0,243	0,125
\bar{x}	0,817	0,744	0,413	0,276	0,210	0,416	0,133	0,237	0,132	0,203	0,111
$\pm s$	<i>0,2668</i>	<i>0,3466</i>	<i>0,2005</i>	<i>0,1266</i>	<i>0,1851</i>	<i>0,0590</i>	<i>0,0920</i>	<i>0,2558</i>	<i>0,0431</i>	<i>0,0720</i>	<i>0,0573</i>

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	0,832	0,452	0,374	0,241	0,148	k ¹	0,092	0,181	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	0,731	0,591	0,439	0,454	0,014	k ¹	0,192	0,242	k ¹	0,403	0,243
Blind 3	0,582	0,224	0,167	0,241	0,220	0,090	0,235	0,154	0,000	0,208	0,255
\bar{x}	0,715 c	0,422 b	0,327 ab	0,312 ab	0,127 a	0,090	0,173 a	0,192 a	0,000	(0,306ab)	(0,249ab)
$\pm s$	<i>0,1258</i>	<i>0,1853</i>	<i>0,1420</i>	<i>0,1230</i>	<i>0,1045</i>		<i>0,0734</i>	<i>0,0451</i>		<i>0,1379</i>	<i>0,0085</i>

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit
 ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 26: Ammoniak in Fermenterflüssigkeit (mmol/l) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage											
	Einstellphase				Konzentratgabe							
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9	
Rafti 1 / V1	25,98	23,58	22,73	21,68	14,9	k ¹	9,55	15,92	k ¹	8,50	k ¹	
Rafti 2 / V1	26,98	23,83	22,73	22,23	15,65	k ¹	10,47	21,55	k ¹	9,25	k ¹	
Rafti 3 / V2	24,52	22,50	21,75	21,55	20,97	11,72	13,47	15,72	0,98	7,32	13,57	
Rafti 4 / V2	23,52	22,75	21,70	21,60	21,12	12,67	12,67	17,07	1,68	8,58	15,57	
Rafti 5 / V2	26,82	23,55	21,80	21,55	18,67	12,32	13,52	15,82	0,13	6,82	15,18	
Rafti 6 / V3	15,88	21,28	17,83	17,33	16,05	9,234	13,20	13,95	8,2	10,80	13,10	
Rafti 7 / V3	14,48	19,48	17,13	17,03	17,55	11,7	11,95	14,40	7,95	10,75	13,45	
Rafti 8 / V3	17,53	20,73	17,83	17,08	17,85	6,85	12,85	13,85	8	10,20	13,45	
\bar{x}	21,96	22,21	20,44	20,01	17,84	10,75	12,21	16,03	4,49	9,03	14,05	
$\pm s$	5,159	1,565	2,395	2,378	2,328	2,258	1,467	2,491	3,930	1,504	1,043	

Blindwerte der einzelnen Versuche inkl. Signifikanz nach 1 faktorieller Varianzanalyse (24 Stunden Werte)

Blind 1	25,98	23,13	22,53	21,38	16,95	k ¹	14,47	15,62	k ¹	k ¹	k ¹
Blind 2	24,47	22,75	21,20	19,85	19,47	k ¹	20,62	20,22	k ¹	17,67	18,73
Blind 3	17,52	15,67	16,87	14,67	14,97	14,52	14,67	14,97	14,17	12,43	12,68
\bar{x}	22,66 a	20,52 ab	20,20 ab	18,63 ab	17,13 ab	14,52	17,64 ab	17,59 ab	14,17	(15,05 b)	(15,71ab)
$\pm s$	4,515	4,205	2,963	3,520	2,255		4,207	3,712		3,70	4,278

k¹ Keine Datenerhebung, () in statistischer Auswertung geänderte Grundgesamtheit

ab unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile (beginnend mit kleinstem Mittelwert)

Anhang

Tab. 27: Endotoxine in Fermenterflüssigkeit (EU/ml) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Fermenter/ Versuch	Versuchstage										
	<i>Einstellphase</i>				<i>Konzentratgabe</i>						
	1	2	3	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
Rafti 1 / V1	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 2 / V1	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹
Rafti 3 / V2	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	5,31	22,64	325,17	124,49	276,52	285,64	185,30
Rafti 4 / V2	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	12,67	25,07	75,85	91,05	45,08	167,06	42,78
Rafti 5 / V2	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	18,18	26,69	206,59	142,74	66,03	233,95	81,93
Rafti 6 / V3	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	14,53	27,87	25,07	10,07	36,81	41,98	29,05
Rafti 7 / V3	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	12,91	12,91	12,50	12,02	18,71	16,12	6,01
Rafti 8 / V3	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	14,88	6,42	6,01	2,82	29,05	20,26	2,96
\bar{x}					13,08	20,26	108,53	63,86	78,70	127,50	58,01
$\pm s$					4,288	8,645	129,857	63,157	98,227	117,579	68,672

Blindwerte der einzelnen Versuche

Blind 1	k ¹										
Blind 2	k ¹	k ¹	k ¹	k ¹	18,96	k ¹	4,86	8,85	k ¹	3,81	4,79
Blind 3	k ¹										
\bar{x}					18,96		4,86	8,85		3,81	4,79
$\pm s$											

k¹ Keine Datenerhebung

Anhang

9.2.2.2 Ergebnisse der HGT-Studie

Tab. 28: pH-Wert; ; Nettogasproduktion (NGP); Nettogasproduktion pro 100 mg Substrat, Ammoniak (NH₃) aus HGT I inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		pH			NGP [ml]			NGP [ml/100mg Substrat]			NH ₃ [mmol/l]		
		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$	
BW; n = 2	fest	7,11			1,0			k1			15,23		
		7,09	7,1	0,014	0,0	0,5	0,71	k1			15,78	15,51	0,389
	flüssig	6,84			2,0			k1			14,55		
		6,81	6,83	0,021	3,0	2,5	0,71	k1			17,73	16,14	2,251
	H	6,98			1,5			3,0			15,33		
		7,01	7,00	0,021	1,0	1,3	0,35	2,0	2,5	0,71	15,03	15,18	0,212
	R	7,07			k1			k1			15,38		
		7,07	7,07	0,000	0,0	k1	k1	0,0	k1	k1	12,03	13,71	2,369
fest; n = 3	H	6,98			2,5			5,0			11,73		
		7,00			2,0			4,0			11,98		
		6,93	6,97	0,036	0,5	1,7	1,04	1,0	3,3	2,07	12,83	12,18	0,577
	H + R	6,93			6,0			9,6			11,88		
		6,93			6,0			9,6			11,83		
		6,92	6,93	0,006	6,0	6,0	0,00	9,6	9,6	0,02	10,48	11,40	0,794
flüssig; n = 3	H	6,79			8,0			16,0			14,13		
		6,78			8,0			16,0			13,78		
		6,79	6,79	0,006	8,0	8,0	0,00	16,0	16,0	0,00	14,23	14,05	0,236
	H + R	6,74			11,0			17,6			15,4		
		6,73			9,0			14,5			14,80		
		6,72	6,73	0,010	10,0	10,0	1,00	15,9	16,0	1,54	14,60	14,93	0,416

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose
 k1 keine Substrateinwaage/ Fehlwert

Anhang

Tab. 29: pH-Wert; Nettogasproduktion (NGP); Nettgasproduktion pro 100 mg Substrat, Ammoniak (NH₃) aus HGT II inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		pH		NGP [ml]			NGP [ml/100mg Substrat]			NH ₃ [mmol/l]		
		\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$	
BW; n = 2	fest	6,97		3,0		k1			19,85			
		6,95	6,96	0,014	2,0	2,5	0,71	k1	19,95	19,90	0,071	
	flüssig	6,93		2,0		k1			19,65			
		6,96	6,95	0,021	0,5	1,3	1,41	k1	18,40	19,03	0,884	
	H	6,99		1,0		2,0			14,90			
		7,01	7,00	0,014	1,0	1,0	0,00	2,0	2,0	0,00	15,05	14,98
R	7,10		0,0		0,0			14,45				
	7,10	7,10	0,000	0,0	0,0	0,71	0,0	0,0	1,41	15,40	14,93	0,672
fest; n = 3	H	6,86		5,0		10,0			18,90			
		6,87		5,0		10,0			17,35			
		6,88	6,87	0,010	7,0	5,7	0,58	14,0	11,3	1,15	17,60	17,95
	H + R	6,86		10,0		16,0			14,95			
		6,83		10,0		16,0			17,95			
		6,84	6,84	0,015	11,0	10,3	0,50	17,6	16,5	0,92	18,30	17,07
flüssig; n = 3	H	6,82		5,0		10,0			18,05			
		6,82		7,0		14,0			19,60			
		6,83	6,82	0,006	6,0	6,0	1,53	12,0	12,0	0,80	17,72	18,46
	H + R	6,78		11,0		17,5			19,20			
		6,76		10,0		16,0			19,95			
		6,76	6,77	0,012	11,5	10,8	1,53	18,4	17,3	3,07	18,95	19,37

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose
 k1 keine Substrateinwaage

Anhang

Tab. 30: pH-Wert; Nettogasproduktion (NGP); Nettogasproduktion pro 100 mg Substrat, Ammoniak (NH₃) aus HGT III inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		pH			NGP [ml]			NGP [ml/100mg Substrat]			NH ₃ [mmol/l]		
		\bar{x}		$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$	
BW; n = 2	fest	7,30			k1			k1			13,433		
		7,27	7,29	0,021	1,0	1,0	1,06	k1			14,783	14,11	0,955
	flüssig	7,16			1,0			k1			13,883		
		7,21	7,19	0,035	0,0	0,5	0,71	k1			13,933	13,91	0,035
	H	7,20			1,0			2,0			9,783		
		7,16	7,18	0,028	2,0	1,5	0,71	4,0	3,0	1,40	10,733	10,26	0,672
	R	7,31			0,5			1,0			11,383		
		7,30	7,31	0,007	0,0	0,3	0,35	0,0	0,5	0,7	9,683	10,53	1,202
fest; n = 3	H	7,40			1,0			2,0			14,083		
		7,27			0,5			1,0			14,533		
		7,30	7,32	0,068	0,5	0,7	0,29	1,0	1,3	0,58	14,133	14,25	0,247
	H + R	7,20			3,5			5,6			14,133		
		7,24			5,0			7,9			12,883		
		7,18	7,21	0,031	2,5	3,7	1,26	4,0	5,8	1,98	13,833	13,62	0,653
flüssig; n = 3	H	7,18			1,0			2,0			13,633		
		7,19			1,0			2,0			13,283		
		7,15	7,17	0,021	1,0	1,0	0,00	2,0	2,0	0,01	13,533	13,48	0,180
	H + R	7,11			4,0			6,3			11,833		
		7,13			4,0			6,4			13,183		
		7,08	7,11	0,025	4,0	4,0	0,00	6,4	6,4	0,06	11,733	12,25	0,810

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose
 k1 keine Substrateinwaage

Anhang

Tab. 31: Fettsäuren (FFS), Gesamtlaktat (Ges. Laktat), L-, D- Laktat aus HGT I inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		FFS [mmol/l]		FFS/100 mg Substrat		Ges.-Laktat [mmol/l]		L-Laktat [mmol/l]		D-Laktat [mmol/l]	
		\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	23,291		k1		0,115		0,075		0,041	
		15,707	19,499 5,3627	k1		0,126	0,121 0,0076	0,082	0,078 0,0050	0,044	0,042 0,0025
	flüssig	34,840		k1		0,048		0,036		0,012	
		36,936	35,888 1,4821	k1		0,062	0,055 0,0101	0,036	0,036 0,0000	0,026	0,019 0,0101
	H	6,769		13,511		1,300		1,238		0,062	
		2,539	4,654 2,9911	5,048	9,279 5,9844	0,066	0,683 0,8727	0,000	0,619 0,8752	0,066	0,064 0,0025
	R	0,177		0,350		0,000		0,000		0,000	
		0,199	0,188 0,0156	0,392	0,371 0,0296	0,001	0,001 0,0008	0,000	0,000 0,0000	0,001	0,001 0,0008
fest; n = 3	H	11,332		22,574		0,087		0,021		0,066	
		13,890		27,780		0,050		0,050		0,000	
		15,883	13,702 2,2813	31,766	27,373 4,6096	0,084	0,073 0,0206	0,025	0,032 0,0155	0,059	0,041 0,0361
	H + R	19,280		30,848		0,098		0,036		0,062	
		18,679		29,839		0,091		0,032		0,059	
		17,845	18,601 0,7206	28,461	29,716 1,1983	0,105	0,098 0,0072	0,028	0,032 0,0036	0,077	0,066 0,0095
flüssig; n = 3	H	41,472		82,944		0,044		0,025		0,019	
		48,028		96,056		0,048		0,018		0,030	
		42,662	44,054 3,4926	85,324	88,108 6,9853	0,048	0,046 0,0021	0,025	0,023 0,0041	0,023	0,024 0,0055
	H + R	50,793		81,269		0,069		0,043		0,026	
		44,204		71,297		0,048		0,028		0,019	
		45,514	46,837 3,4880	72,590	75,052 5,423	0,073	0,063 0,0135	0,036	0,036 0,0071	0,037	0,028 0,0090

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose
 k1 keine Substrateinwaage

Anhang

Tab. 32: Fettsäuren (FFS), Gesamtlaktat (ges. Laktat), L-, D- Laktat aus HGT II inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		FFS [mmol/l]		FFS/100 mg Substrat		Ges.-Laktat [mmol/l]		L-Laktat [mmol/l]		D-Laktat [mmol/l]	
		\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	20,617		k1		0,028		0,025		0,004	
		20,083	20,350 0,3776	k1		0,032	0,030 0,0025	0,032	0,028 0,0050	0,000	0,002 0,0025
	flüssig	39,549		k1		0,028		0,028		0,000	
		39,534	39,542 0,0106	k1		0,018	0,018 0,0001	0,014	0,021 0,0101	0,004	0,002 0,0025
	H	2,261		4,522		1,449		1,248		0,201	
		0,970	1,616 0,9129	1,940	3,231 1,8257	1,232	1,341 0,1538	1,096	1,172 0,1081	0,136	0,169 0,0457
	R	0,264		0,530		0,018		0,018		0,000	
		0,171	0,218 0,0658	0,342	0,436 0,1330	0,021	0,007 0,0101	0,021	0,020 0,0025	0,000	0,000 0,0000
fest; n = 3	H	24,598		49,196		0,011		0,000		0,011	
		23,142		46,284		0,036		0,028		0,007	
		30,169	25,970 3,7089	60,338	51,939 7,4178	0,036	0,027 0,0143	0,036	0,021 0,0188	0,000	0,006 0,0055
	H + R	27,994		44,719		0,046		0,036		0,011	
		36,555		58,488		0,025		0,025		0,000	
		31,685	32,078 4,2940	50,696	51,301 6,9045	0,075	0,045 0,0303	0,071	0,044 0,0242	0,004	0,005 0,0055
flüssig; n = 3	H	41,117		82,070		0,054		0,036		0,018	
		46,079		92,158		0,043		0,043		0,000	
		44,832	44,009 2,5813	89,664	87,964 5,2545	0,061	0,052 0,0090	0,050	0,043 0,0071	0,011	0,010 0,0090
	H + R	50,269		80,174		0,057		0,053		0,004	
		45,638		73,021		0,050		0,050		0,000	
		52,099	49,335 3,3302	83,358	78,851 5,2942	0,053	0,053 0,0036	0,053	0,052 0,0021	0,000	0,001 0,0021

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose
 k1 keine Substrateinwaage

Anhang

Tab. 33: Fettsäuren (FFS), Gesamtlaktat (ges. Laktat), L-, D- Laktat aus HGT III inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		FFS [mmol/l]			FFS/100 mg Substrat			Ges.-Laktat [mmol/l]			L-Laktat [mmol/l]			D-Laktat [mmol/l]			
		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		
BW; n = 2	fest	16,297			k1			0,230			0,144			0,086			
		17,753	17,025	1,0295	k1			0,266	0,248	0,0252	0,173	0,158	0,0201	0,093	0,090	0,0051	
	flüssig	25,593			k1			0,273			0,140			0,133			
		24,263	24,928	0,9405	k1			0,316	0,294	0,0299	0,229	0,185	0,0629	0,086	0,109	0,0330	
	H	2,784			5,5792			0,240			0,205			0,036			
		1,081	1,933	1,2042	2,1534	3,866	2,4224	0,422	0,331	0,1283	0,375	0,290	0,1207	0,047	0,041	0,0076	
	R	8,287			16,3775			0,062			0,041			0,022			
		2,360	5,324	4,1910	4,7485	10,563	8,2229	0,030	0,046	0,0227	0,016	0,028	0,0176	0,014	0,018	0,0051	
fest; n = 3	H	13,193			26,3860			0,198			0,116			0,083			
		13,041			26,0299			0,180			0,119			0,061			
		11,400	12,545	0,9942	22,6640	25,027	2,0538	0,155	0,178	0,0215	0,098	0,111	0,0114	0,057	0,067	0,0136	
	H + R	16,593			26,3800			0,173			0,112			0,061			
		14,597			23,1331			0,230			0,162			0,068			
		14,794	15,328	1,0999	23,5949	24,369	1,7565	0,212	0,205	0,0292	0,133	0,136	0,0250	0,079	0,069	0,0090	
flüssig; n = 3	H	26,840			53,3598			0,159			0,112			0,047			
		58,005			116,7103			0,266			0,176			0,090			
		37,063	40,636	15,8868	74,1260	81,399	32,2953	0,291	0,238	0,0702	0,176	0,155	0,0370	0,115	0,084	0,0345	
	H + R	25,226			39,9146			0,287			0,219			0,068			
		29,762			47,9259			0,244			0,169			0,075			
		32,233	29,074	3,5539	51,2448	46,362	5,8248	0,266	0,266	0,0213	0,190	0,193	0,0250	0,075	0,073	0,0041	

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose
 k1 keine Substrateinwaage

Anhang

Tab. 34: Azetat (mmol/l) in Kolbenflüssigkeit der HGT-Versuche (HGT I, II, III) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		HGT I			HGT II			HGT III		
			\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	15,939			13,090			16,297		
		10,819	13,379	<i>3,6204</i>	12,771	12,931	<i>0,2256</i>	17,753	17,025	<i>1,0295</i>
	flüssig	22,376			25,621			25,593		
		24,080	23,228	<i>1,2049</i>	25,679	25,650	<i>0,0410</i>	24,263	24,928	<i>0,9405</i>
	H	5,185			1,862			2,784		
		1,986	3,586	<i>2,2620</i>	0,821	1,342	<i>0,7361</i>	1,081	1,933	<i>1,2042</i>
R	0,060			0,139			8,287			
	0,102	0,081	<i>0,0297</i>	0,066	0,103	<i>0,0516</i>	2,360	5,324	<i>4,1910</i>	
fest; n = 3	H	6,995			14,521			13,193		
		9,229			14,052			13,041		
		10,779	9,001	<i>1,9023</i>	18,257	15,610	<i>2,3043</i>	11,400	12,545	<i>0,9942</i>
	H + R	12,396			16,507			16,593		
		11,678			20,691			14,597		
		11,097	11,724	<i>0,6507</i>	18,752	18,650	<i>2,0939</i>	14,794	15,328	<i>1,0999</i>
flüssig; n = 3	H	26,202			25,708			26,840		
		30,777			29,173			58,005		
		27,953	28,311	<i>2,3084</i>	28,457	27,779	<i>1,8292</i>	37,063	40,636	<i>15,8868</i>
	H + R	32,424			31,751			25,226		
		27,878			27,806			29,762		
		28,291	29,531	<i>2,5139</i>	32,377	30,645	<i>2,4782</i>	32,233	29,074	<i>3,5539</i>

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose

Anhang

Tab. 35: Propionat (mmol/l) in Kolbenflüssigkeit der HGT-Versuche (HGT I, II, III) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		HGT I			HGT II			HGT III		
			\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	5,015			5,234			2,891		
		3,444	4,230	<i>1,1109</i>	5,123	5,179	<i>0,0785</i>	3,487	3,189	<i>0,4214</i>
	flüssig	8,763			8,877			5,267		
		9,062	8,913	<i>0,2114</i>	9,334	9,106	<i>0,3231</i>	4,768	5,018	<i>0,3528</i>
	H	1,098			0,334			0,329		
		0,366	0,732	<i>0,5176</i>	0,092	0,213	<i>0,1711</i>	0,000	0,165	<i>0,2326</i>
R	0,066			0,057			1,232			
	0,058	0,062	<i>0,0057</i>	0,039	0,048	<i>0,0127</i>	0,382	0,807	<i>0,6010</i>	
fest; n = 3	H	3,585			7,663			3,316		
		3,777			6,941			3,225		
		4,021	3,794	<i>0,2185</i>	8,973	7,859	<i>1,0301</i>	2,826	3,122	<i>0,2606</i>
	H + R	5,934			9,183			4,190		
		6,075			11,234			3,926		
		5,852	5,954	<i>0,1128</i>	10,139	10,185	<i>1,0263</i>	3,640	3,919	<i>0,2751</i>
flüssig; n = 3	H	11,367			10,354			6,271		
		12,657			11,180			13,394		
		10,842	11,622	<i>0,9340</i>	11,114	10,883	<i>0,4590</i>	8,000	9,222	<i>3,7153</i>
	H + R	13,768			12,959			5,918		
		12,433			11,975			7,066		
		13,157	13,119	<i>0,6683</i>	13,388	12,774	<i>0,7244</i>	8,006	6,997	<i>1,0457</i>

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose

Anhang

Tab. 36: N-Butyrat (mmol/l) in Kolbenflüssigkeit der HGT-Versuche (HGT I, II, III) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		HGT I			HGT II			HGT III		
			\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	1,694			1,654			1,197		
		1,189	1,442	<i>0,3571</i>	1,581	1,618	<i>0,0516</i>	1,490	1,344	<i>0,2072</i>
	flüssig	2,843			3,726			2,263		
		2,822	2,833	<i>0,0148</i>	3,529	3,628	<i>0,1393</i>	2,040	2,152	<i>0,1577</i>
	H	0,307			0,048			0,090		
		0,103	0,205	<i>0,1442</i>	0,030	0,039	<i>0,0127</i>	0,000	0,045	<i>0,0636</i>
	R	0,019			0,014			0,329		
		0,000	0,010	<i>0,0134</i>	0,018	0,016	<i>0,0028</i>	0,067	0,198	<i>0,1853</i>
fest; n = 3	H	0,657			1,731			0,950		
		0,744			1,622			0,957		
		0,777	0,726	<i>0,0620</i>	2,194	1,849	<i>0,3037</i>	0,842	0,916	<i>0,0645</i>
	H + R	0,803			1,731			1,162		
		0,781			3,117			0,762		
		0,700	0,761	<i>0,0542</i>	2,099	2,316	<i>0,7180</i>	1,014	0,979	<i>0,2022</i>
flüssig; n = 3	H	2,999			3,885			2,075		
		3,607			4,359			5,083		
		3,130	3,245	<i>0,3200</i>	4,152	4,132	<i>0,2376</i>	2,824	3,327	<i>1,5659</i>
	H + R	3,590			4,645			1,737		
		3,115			4,534			2,040		
		3,175	3,293	<i>0,2587</i>	4,904	4,694	<i>0,1899</i>	2,384	2,054	<i>0,3237</i>

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose

Anhang

Tab. 37: I-Butyrat (mmol/l) in Kolbenflüssigkeit der HGT-Versuche (HGT I, II, III) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		HGT I			HGT II			HGT III		
			\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	0,119			0,184			0,000		
		0,059	0,089	0,0424	0,206	0,195	0,0156	0,158	0,079	0,1117
	flüssig	0,311			0,424			0,317		
		0,296	0,304	0,0106	0,276	0,350	0,1047	0,227	0,272	0,0636
	H	0,039			0,000			0,047		
		0,023	0,031	0,0113	0,027	0,014	0,0191	0,000	0,024	0,0332
R	0,000			0,020			0,019			
	0,000	0,000	0,0000	0,037	0,029	0,0120	0,021	0,020	0,0014	
fest; n = 3	H	0,000			0,249			0,076		
		0,031			0,186			0,048		
		0,053	0,028	0,0266	0,250	0,228	0,0367	0,055	0,060	0,0146
	H + R	0,046			0,173			0,127		
		0,038			0,353			0,066		
		0,085	0,056	0,0251	0,238	0,255	0,0912	0,089	0,094	0,0308
flüssig; n = 3	H	0,325			0,337			0,248		
		0,364			0,410			0,741		
		0,248	0,312	0,0590	0,350	0,366	0,0389	0,353	0,447	0,2597
	H + R	0,341			0,000			0,186		
		0,255			0,434			0,217		
		0,299	0,298	0,0430	0,494	0,309	0,2696	0,287	0,230	0,0517

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose

Anhang

Tab. 38: N-Valeriat (mmol/l) in Kolbenflüssigkeit der HGT-Versuche (HGT I, II, III) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		HGT I			HGT II			HGT III		
			\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	0,202			0,158			0,086		
		0,109	0,156	<i>0,0658</i>	0,143	0,151	<i>0,0106</i>	0,137	0,112	<i>0,0361</i>
	flüssig	0,168			0,281			0,195		
		0,226	0,197	<i>0,0410</i>	0,284	0,283	<i>0,0021</i>	0,136	0,166	<i>0,0417</i>
	H	0,052			0,000			0,014		
		0,032	0,042	<i>0,0141</i>	0,000	0,000	<i>0,0000</i>	0,000	0,007	<i>0,0099</i>
	R	0,012			0,016			0,058		
		0,025	0,019	<i>0,0092</i>	0,000	0,008	<i>0,0113</i>	0,032	0,045	<i>0,0184</i>
fest; n = 3	H	0,024			0,170			0,036		
		0,043			0,138			0,035		
		0,032	0,033	<i>0,0095</i>	0,201	0,170	<i>0,0315</i>	0,033	0,035	<i>0,0015</i>
	H + R	0,034			0,160			0,109		
		0,024			0,506			0,029		
		0,036	0,031	<i>0,0064</i>	0,204	0,290	<i>0,1884</i>	0,590	0,243	<i>0,3034</i>
flüssig; n = 3	H	0,133			0,287			0,145		
		0,137			0,315			0,812		
		0,094	0,121	<i>0,0238</i>	0,261	0,288	<i>0,0270</i>	0,277	0,411	<i>0,3532</i>
	H + R	0,156			0,321			0,114		
		0,129			0,299			0,117		
		0,154	0,146	<i>0,0150</i>	0,314	0,311	<i>0,0112</i>	0,221	0,151	<i>0,0609</i>

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose

Anhang

Tab. 39: I-Valeriat (mmol/l) in Kolbenflüssigkeit der HGT-Versuche (HGT I, II, III) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		HGT I			HGT II			HGT III		
			\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	0,154			0,288			0,128		
		0,086	0,120	<i>0,0481</i>	0,258	0,273	<i>0,0212</i>	0,140	0,134	<i>0,0085</i>
	flüssig	0,380			0,620			0,404		
		0,397	0,389	<i>0,0120</i>	0,432	0,526	<i>0,1329</i>	0,360	0,382	<i>0,0311</i>
	H	0,053			0,017			0,035		
		0,030	0,042	<i>0,0163</i>	0,000	0,009	<i>0,0120</i>	0,000	0,018	<i>0,0247</i>
	R	0,020			0,019			0,035		
		0,014	0,017	<i>0,0042</i>	0,012	0,016	<i>0,0049</i>	0,017	0,026	<i>0,0127</i>
fest; n = 3	H	0,071			0,252			0,086		
		0,066			0,202			0,116		
		0,221	0,119	<i>0,0881</i>	0,295	0,250	<i>0,0465</i>	0,073	0,092	<i>0,0221</i>
	H + R	0,067			0,225			0,157		
		0,083			0,432			0,077		
		0,074	0,075	<i>0,0080</i>	0,253	0,303	<i>0,1123</i>	0,118	0,117	<i>0,0400</i>
flüssig; n = 3	H	0,435			0,520			0,329		
		0,486			0,621			0,000		
		0,394	0,438	<i>0,0461</i>	0,482	0,541	<i>0,0718</i>	0,434	0,254	<i>0,2264</i>
	H + R	0,513			0,592			0,258		
		0,394			0,590			0,279		
		0,438	0,448	<i>0,0602</i>	0,621	0,601	<i>0,0173</i>	0,365	0,301	<i>0,0567</i>

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose

Anhang

Tab. 40: N-Capronat (mmol/l) in Kolbenflüssigkeit der HGT-Versuche (HGT I, II, III) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		HGT I			HGT II			HGT III		
			\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	0,169			0,009			0,000		
		0,000	0,085	<i>0,1195</i>	0,000	0,005	<i>0,0064</i>	0,068	0,034	<i>0,0481</i>
	flüssig	0,000			0,000			0,000		
		0,053	0,027	<i>0,0375</i>	0,000	0,000	<i>0,0000</i>	0,011	0,006	<i>0,0078</i>
	H	0,035			0,000			0,019		
		0,000	0,018	<i>0,0247</i>	0,000	0,000	<i>0,0000</i>	0,000	0,010	<i>0,0134</i>
	R	0,000			0,000			0,036		
		0,000	0,000	<i>0,0000</i>	0,000	0,000	<i>0,0000</i>	0,000	0,018	<i>0,0255</i>
fest; n = 3	H	0,000			0,011			0,000		
		0,000			0,000			0,000		
		0,000	0,000	<i>0,0000</i>	0,000	0,004	<i>0,0064</i>	0,000	0,000	<i>0,0000</i>
	H + R	0,000			0,014			0,000		
		0,000			0,220			0,000		
		0,000	0,000	<i>0,0000</i>	0,000	0,078	<i>0,1232</i>	0,010	0,003	<i>0,0058</i>
flüssig; n = 3	H	0,011			0,027			0,000		
		0,000			0,020			0,465		
		0,000	0,004	<i>0,0064</i>	0,015	0,021	<i>0,0060</i>	0,102	0,189	<i>0,2444</i>
	H + R	0,000			0,000			0,000		
		0,000			0,000			0,010		
		0,000	0,000	<i>0,0000</i>	0,000	0,000	<i>0,0000</i>	0,069	0,026	<i>0,0373</i>

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose

Anhang

Tab. 41: Azetat-Propionat-Quotient (mmol/l) in Kolbenflüssigkeit der HGT-Versuche (HGT I, II, III) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		HGT I			HGT II			HGT III			
			\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$	
BW; n = 2	fest	3,178			2,501			4,149			
		3,141	3,160	0,0261	2,493	2,497	0,0057	3,519	3,834	0,4455	
	flüssig	2,553			2,886			3,256			
		2,657	2,605	0,0734	2,751	2,819	0,0955	3,507	3,381	0,1774	
	H	4,722			5,575			6,842			
		5,426	5,074	0,4978	8,924	7,249	2,3681	k2	k2	k2	
R	0,909			2,439			5,339				
fest; n = 3	H	1,759	1,334	0,6007	1,692	2,065	0,5277	4,817	5,078	0,3695	
		1,951			1,895			2,632			
		2,443			2,024			2,685			
	H + R	2,681	2,358	0,3721	2,035	1,985	0,0779	2,679	2,666	0,0290	
		2,089			1,798			2,589			
		1,922			1,842			2,480			
flüssig; n = 3	H	1,896	1,969	0,1046	1,849	1,830	0,0280	2,710	2,593	0,1149	
		2,305			2,483			2,834			
		2,432			2,609			2,801			
	H + R	2,578	2,438	0,1367	2,560	2,551	0,0638	3,134	2,923	0,1837	
		2,355			2,450			2,875			
		2,242			2,322			2,835			
			2,150	2,249	0,1026	2,418	2,397	0,0667	2,611	2,774	0,1424

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose
 k2 mathematischer Fehler: Division durch 0

Anhang

Tab. 42: Summe der Iso-Fettsäuren (mmol/l) in Kolbenflüssigkeit der HGT-Versuche (HGT I, II, III) inkl. Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$)

Variante		HGT I			HGT II			HGT III		
			\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$		\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	0,273			0,472			0,128		
		0,145	0,209	<i>0,0905</i>	0,464	0,468	<i>0,0057</i>	0,298	0,213	<i>0,1202</i>
	flüssig	0,691			1,044			0,721		
		0,693	0,692	<i>0,0014</i>	0,708	0,876	<i>0,2376</i>	0,587	0,654	<i>0,0948</i>
	H	0,092			0,017			0,082		
		0,053	0,073	<i>0,0276</i>	0,027	0,022	<i>0,0071</i>	0,000	0,041	<i>0,0580</i>
	R	0,020			0,039			0,054		
		0,014	0,017	<i>0,0042</i>	0,049	0,044	<i>0,0071</i>	0,038	0,046	<i>0,0113</i>
fest; n = 3	H	0,071			0,501			0,162		
		0,097			0,388			0,164		
		0,274	0,147	<i>0,1105</i>	0,545	0,478	<i>0,0810</i>	0,128	0,151	<i>0,0202</i>
	H + R	0,113			0,398			0,284		
		0,121			0,785			0,143		
		0,159	0,131	<i>0,0246</i>	0,491	0,558	<i>0,2020</i>	0,207	0,211	<i>0,0706</i>
flüssig; n = 3	H	0,760			0,857			0,577		
		0,850			1,031			0,741		
		0,642	0,751	<i>0,1043</i>	0,832	0,907	<i>0,1084</i>	0,787	0,702	<i>0,1104</i>
	H + R	0,854			0,592			0,444		
		0,649			1,024			0,496		
		0,737	0,747	<i>0,1028</i>	1,115	0,910	<i>0,2794</i>	0,652	0,531	<i>0,1082</i>

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose

Anhang

Tab. 43: Einzeldaten, Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Gasbildung (GB) in ml/100 mg Substrat an den verschiedenen Messzeiten (t0 – t3) aller HGT-Versuche

GB ml/100mg Variante		HGT I				HGT II				HGT III				\bar{x}				
		t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3	
BW; n = 2	fest	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	$\pm s$	k1	k1	k1	k1
		k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1		k1	k1	k1	k1
	flüssig	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	$\pm s$	k1	k1	k1	k1
		k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1		0,2	0,5	0,8	2,5
	H	0,0	1,0	2,0	3,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	1,0	2,0	$\pm s$	<i>0,41</i>	<i>0,83</i>	<i>0,98</i>	<i>0,83</i>
		1,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	2,0	2,0	4,0		0,2	0,0	0,0	0,2
	R	0,0	k1	k1	k1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	$\pm s$	<i>0,41</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,44</i>
		1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,1	0,9	1,6	4,7
fest; n = 3	H	0,0	0,0	2,0	5,0	0,0	2,0	2,0	10,0	0,0	0,0	2,0	2,0	$\pm s$	<i>0,11</i>	<i>0,89</i>	<i>1,78</i>	<i>5,33</i>
		1,0	0,0	1,0	4,0	0,0	2,0	2,0	10,0	0,0	1,0	1,0	1,0		0,1	1,4	3,3	10,6
		0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	4,0	14,0	0,0	1,0	1,0	1,0		<i>0,11</i>	<i>1,51</i>	<i>3,55</i>	<i>10,64</i>
	H + R	0,0	1,6	2,4	9,6	0,0	1,6	6,4	16,0	0,0	0,8	2,4	5,6	$\pm s$	<i>0,11</i>	<i>1,51</i>	<i>3,55</i>	<i>10,64</i>
		1,0	0,8	1,6	9,6	0,0	3,2	6,4	16,0	0,0	0,0	2,4	7,9		0,1	1,8	5,6	13,5
		0,0	1,6	1,6	9,6	0,0	3,2	8,0	17,6	0,0	0,8	0,8	4,0		<i>0,11</i>	<i>1,78</i>	<i>5,42</i>	<i>13,24</i>
flüssig; n = 3	H	0,0	6,0	10,0	16,0	0,0	1,0	2,0	10,0	0,0	0,0	1,0	2,0	$\pm s$	<i>0,11</i>	<i>1,89</i>	<i>4,33</i>	<i>10,00</i>
		1,0	2,0	7,0	16,0	0,0	2,0	6,0	14,0	0,0	0,0	1,0	2,0		0,1	1,8	5,6	13,5
		0,0	4,0	8,0	16,0	0,0	2,0	4,0	12,0	0,0	0,0	0,0	2,0		<i>0,11</i>	<i>1,78</i>	<i>5,42</i>	<i>13,24</i>
	H + R	0,0	3,2	8,0	17,6	0,0	1,6	6,4	17,5	0,0	1,6	3,2	6,3	$\pm s$	<i>0,11</i>	<i>1,78</i>	<i>5,42</i>	<i>13,24</i>
		1,0	1,6	6,5	14,5	0,0	0,0	4,8	16,0	0,0	1,6	2,4	6,4		0,1	1,8	5,6	13,5
		0,0	3,2	8,0	15,9	0,0	3,2	8,0	18,4	0,0	0,0	1,6	6,4		<i>0,11</i>	<i>1,78</i>	<i>5,42</i>	<i>13,24</i>

BW	Blindwerte	t0	0 h Inkubationszeit
Fest	Zäkuminhalt Festphase	t1	3 h Inkubationszeit
Flüssig	Zäkuminhalt Flüssigphase	t2	6 h Inkubationszeit
H	Heu	t3	18 h Inkubationszeit
R	Raffinose	k1	keine Messung/ ohne Substrateinwaage

Anhang

Tab. 44: Einzeldaten, Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Gasbildung im Intervall (GB-I/ 100 mg* h) in ml/ 100 mg Substrat pro Stunde an den verschiedenen Messzeiten (t0 – t3) aller HGT-Versuche

GB-I ml/ 100 mg* h Variante		HGT I				HGT II				HGT III				\bar{x}				
		t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3		t0	t1	t2	t3
BW; n = 2	fest	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	$\pm s$	k1	k1	k1	k1
		k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1		k1	k1	k1	k1
	flüssig	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	$\pm s$	k1	k1	k1	k1
		k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1	k1		0,0	0,2	0,2	0,2
	H	0,0	0,3	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,3	0,1	$\pm s$	0,00	0,28	0,27	0,06
		0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,7	0,7	0,2		0,0	0,0	0,0	0,0
	R	0,0	k1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	$\pm s$	0,00	0,00	0,00	0,04
		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,3	0,4	0,2
fest; n = 3	H	0,0	0,0	0,7	0,2	0,0	0,7	0,0	0,8	0,0	0,0	0,7	0,0	$\pm s$	0,00	0,26	0,35	0,34
		0,0	0,0	0,3	0,3	0,0	0,7	0,0	0,8	0,0	0,3	0,3	0,0		0,0	0,5	0,7	0,5
		0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,3	1,0	0,0	0,0	0,3	0,3	0,0		0,00	0,36	0,59	0,16
	H + R	0,0	0,5	0,3	0,6	0,0	0,5	1,6	0,6	0,0	0,3	0,8	0,3	$\pm s$	0,00	0,36	0,59	0,16
		0,0	0,3	0,3	0,7	0,0	1,1	1,1	0,6	0,0	0,0	0,8	0,6		0,4	0,5	1,2	0,8
		0,0	0,5	0,0	0,7	0,0	1,1	1,6	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3		0,91	0,49	0,53	0,21
flüssig; n = 3	H	0,0	2,0	1,3	0,5	0,0	0,3	0,3	0,8	0,0	0,0	0,3	0,1	$\pm s$	0,00	0,68	0,60	0,29
		0,0	0,7	1,7	0,8	0,0	0,7	1,3	0,8	0,0	0,0	0,3	0,1		0,4	0,5	1,2	0,8
		0,0	1,3	1,3	0,7	0,0	0,7	0,7	0,4	0,0	0,0	0,0	0,2		0,91	0,49	0,53	0,21
	H + R	0,0	1,1	1,6	0,8	0,0	0,5	1,6	1,0	0,0	0,0	0,5	1,1	$\pm s$	0,91	0,49	0,53	0,21
		0,0	0,5	1,6	0,7	0,0	0,0	1,6	1,0	1,6	0,0	0,5	0,5		0,4	0,5	1,2	0,8
		0,0	1,1	1,6	0,7	0,0	1,1	1,6	1,0	2,4	0,0	0,5	0,5		0,91	0,49	0,53	0,21

BW	Blindwerte	t0	0 h Inkubationszeit
Fest	Zäkuminhalt Festphase	t1	0-3 h Inkubationszeit
Flüssig	Zäkuminhalt Flüssigphase	t2	3-6 h Inkubationszeit
H	Heu	t3	6-18 h Inkubationszeit
R	Raffinose	k1	keine Messung/ ohne Substrateinwaage

Anhang

Tab. 45: Einzeldaten, Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) der Konzentration an Wasserstoff und Methan im Gasgemisch in $\mu\text{mol/l}$ aller HGT-Versuche

Variante		H ₂ [$\mu\text{mol/l}$]					CH ₄ [$\mu\text{mol/l}$]				
		HGT I	HGT II	HGT III	\bar{x}	$\pm s$	HGT I	HGT II	HGT III	\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	k1	12,10	14,58	9,05	6,378	k1	710,04	10,54	330,86	378,521
		k1	9,53	0,00			k1	602,86	0,00		
	flüssig	k1	2,82	0,00	5,19	8,776	k1	0,00	0,00	151,31	338,339
		20,71	2,40	0,00			756,55	0,00	0,00		
H	253,96	36,39	0,00	58,07	110,634	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	
	k1	0,00	0,00			k1	0,00	0,00			
R	k1	k1	0,00	3,34	5,791	k1	k1	0,00	207,16	358,815	
	k1	10,03	0,00			k1	621,49	0,00			
fest; n = 3	H	1263,83	12,02	234,04	372,07	660,613	0,00	689,45	8,43	203,01	300,590
		1755,90	0,00	24,56			0,00	15,03	644,87		
		23,65	11,69	22,91			0,00	449,29	20,02		
	H + R	358,89	11,31	97,71	697,04	1215,927	0,00	418,50	18,26	95,66	184,745
2623,06		0,00	146,39	0,00			0,00	0,00			
3026,57	9,39	0,00	0,00	424,17	0,00						
flüssig; n = 3	H	72,61	17,43	7,20	25,07	21,769	558,34	2650,65	362,82	1112,41	1041,012
		29,55	12,57	0,00			1094,62	2393,73	0,00		
		39,68	31,34	15,27			683,62	2222,58	45,31		
	H + R	15,51	9,53	0,00	21,00	22,631	451,39	1062,28	0,00	516,53	518,845
60,74		0,00	k1	262,16			0,00	k1			
25,30	8,04	48,86	1173,53	1111,62	71,30						

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose
 k1 keine Messung/ ohne Substrateinwaage

Anhang

Tab. 46: Einzeldaten, Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichung ($\pm s$) des Wasserstoff-Methan-Quotienten ($H_2:CH_4$) aller HGT-Versuche

Variante		$H_2:CH_4$				
		HGT I	HGT II	HGT III	\bar{x}	$\pm s$
BW; n = 2	fest	k1	0,02	1,38	0,47	0,789
		k1	0,02	k2		
	flüssig	k1	k2	k2	0,03	#DIV/0!
		0,03	k2	k2		
H	k2	k2	k2			
	k1	k2	k2			
R	k1	k1	k2	0,02	#DIV/0!	
	k1	0,02	k2			
fest; n = 3	H	k2	0,02	27,76	4,83	11,244
		k2	0,00	0,04		
		k2	0,03	1,14		
	H + R	k2	0,03	5,35	1,80	3,075
k2		k2	k2			
flüssig; n = 3	H	0,13	0,01	0,02	0,07	0,114
		0,03	0,01	k2		
		0,06	0,01	0,34		
	H + R	0,03	0,01	k2	0,16	0,269
		0,23	k2	k1		
		0,02	0,01	0,69		

BW Blindwerte
 Fest Zäkuminhalt Festphase
 Flüssig Zäkuminhalt Flüssigphase
 H Heu
 R Raffinose
 k1 keine Messung/ ohne Substrateinwaage
 k2 mathematischer Fehler/ Division durch 0

Anhang

Tab. 47: Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichung ($\pm s$) und Signifikanzen der Parameter der Caesitec-Studie mit Wechselwirkungen zwischen Versuch (V1, V2, V3) und Tag (T1 – T9) sowie Versuch und Zeit (12 Stunden ppr.: T5,5; T7,5) jeweils berechnet durch 1-faktorielle Varianzanalyse

Tab. 47 a: Redoxpotential

Redox	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	$\pm s^2$	$\pm s^3$
\bar{x} V1	366abA	361abA	366abA	372bA	370abA	k1	355aB	362abA	k1	355aA	k1	6,2	
\bar{x} V2	365bA	364bA	363bA	366bA	362bA	k1	293aA	366bA	k1	364bB	369b	12,4	
\bar{x} V3	381cdB	366bcA	361abA	377bcA	394edB	k1	375bcB	405eB	k1	346aA	402e	8,9	
$\pm s^1$	5,8	9,2	8,3	6,5	4,7		18,8	14,9		3,8	8,0		

Tab. 47 b: pH-Wert

pH	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	$\pm s^2$	$\pm s^3$
\bar{x} V1	6,58cA	6,62cdA	6,64cdA	6,69dA	6,71dA	k1	6,36bA	6,63cdA	k1	6,21aA	k1	0,045	
\bar{x} V2	6,58cA	6,69dA	6,67dA	6,73dA	6,66dA*	4,75#	6,26aA	6,69dA*	4,98°	6,38bA	6,38d	0,032	0,084
\bar{x} V3	6,96dB	6,66cA	6,94dB	6,95dB	7,05dB*	5,37#	6,47bB	7,11dB*	4,79°	6,08aA	6,78c	0,089	0,055
$\pm s^1$	0,032	0,032	0,045	0,055	0,032	0,000	0,045	0,063	0,114	0,145	0,032		

Anhang

Tab. 47 c: Gasproduktion in ml

Gas	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	±s ²	±s ³
\bar{x} V1	585abB	445abB	435abAB	380aA	540abAB	k1	3625cC	685bA	k1	k1	k1	102,0	
\bar{x} V2	870aC	410aB	520aB	420aA	737aB	k1	3134bB	567aA	k1	3739c	520a	264,1	
\bar{x} V3	363aA	196aA	216aA	346aA	293aA	k1	1809bA	423aA	k1	1973b	466a	175,1	
±s ¹	85,0	84,0	105,1	110,3	161,5		215,1	128,0		397,4	67,2		

Tab. 47 d: Konzentration an Gesamtlaktat in mmol/l

Gesamt-laktat	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	±s ²	±s ³
\bar{x} V1	0,040aA	0,032aA	0,016aA	0,008aA	0,014aA	k1	0,013aA	0,215aA	k1	0,029aA	k1	0,1000	
\bar{x} V2	0,059aA	0,037aA	0,041aA	0,059aB	0,033aB*	63,199#	7,745bB	0,048aA*	9,145°	0,048aA	0,044a	0,4254	1,1891
\bar{x} V3	0,129aA	0,089aB	0,059aA	0,041aAB	0,035aB*	45,787#	40,325bC	0,023aA*	57,547°	39,866bB	1,207a	3,2700	2,9791
±s ¹	0,0447	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,6772	1,5027	0,1265	4,2149	5,9426	1,4014		

Tab. 47 e: Konzentration an L-Laktat in mmol/l

L-Laktat	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	±s ²	±s ³
\bar{x} V1	0,020aA	0,011aA	0,000aA	0,000aA	0,000aA	k1	0,002aA	0,168aA	k1	0,027aA	k1	0,0775	
\bar{x} V2	0,033aA	0,030aAB	0,030aAB	0,059aB	0,033aC*	49,571#	5,676bB	0,048aA*	7,431°	0,048aA	0,044a	0,4382	1,1063
\bar{x} V3	0,093aA	0,050aB	0,043aB	0,020aAB	0,018aB*	42,480#	31,943bC	0,019aA*	41,511#	27,022cB	0,823a	2,8012	3,9008
±s ¹	0,0447	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,5090	1,1489	0,1000	5,5318	5,1812	0,9844		

Anhang

Tab. 47 f: Konzentration an D-Laktat in mmol/l

D-Laktat	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	$\pm s^2$	$\pm s^3$
\bar{x} V1	0,021aA	0,021aA	0,016aA	0,008aAB	0,014aB	k1	0,011aA	0,047aA	k1	0,002aA	k1	0,0000	
\bar{x} V2	0,026aA	0,007aA	0,011aA	0,000aA	0,000aA*	13,629#	2,069bB	0,000aA*	1,713°	0,000aA	0,000a	0,0316	0,5109
\bar{x} V3	0,036aA	0,038aB	0,016aA	0,022aB	0,017aB*	3,307#	8,383bC	0,004aA*	16,037°	12,844cB	0,383a	0,5882	0,9306
$\pm s^1$	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6626	0,6760	0,0316	1,3476	0,8075	0,4171		

Tab. 47 g: Konzentration an Ammoniak in mmol/l

NH3	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	$\pm s^2$	$\pm s^3$
\bar{x} V1	26,480eB	23,705deB	22,730dC	21,955cdB	15,275bA	k1	10,010aA	18,735cB	k1	8,875aA	k1	1,4799	
\bar{x} V2	24,950fB	22,933eB	21,750deB	21,567deB	20,250dB*	12,237#	13,217bB	16,200cAB°	0,933+	9,184aA	14,772bc	0,9306	0,9061
\bar{x} V3	15,967dA	20,500fA	17,600eA	17,150deA	17,150deA*	9,261#	12,667bB	14,067cA°	8,050#	10,583aB	13,333bc	0,7416	1,3149
$\pm s^1$	1,4758	0,6834	0,2569	0,2025	1,0877	1,7481	0,5848	1,8520	0,5568	0,6557	0,7629		

Tab. 47 h: Konzentration an Gesamtfettsäuren in mmol/l

FFS	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	$\pm s^2$	$\pm s^3$
\bar{x} V1	48,774cAB	31,883bA	28,811abA	18,641aA	24,655abA	k1	55,112cC	30,745abA	k1	68,540dC	k1	5,0779	
\bar{x} V2	55,802dB	35,730bcA	30,436abA	23,482aAB	25,989abA*	24,274*	43,986cB	33,419bA*	60,430#	55,669dB	28,308ab	5,2383	5,9355
\bar{x} V3	34,856abA	57,746bA	35,266abA	28,808aB	20,893aA*#	18,714#	20,531aA	25,609aA*	18,633#	16,706aA	23,490a	15,1714	3,3764
$\pm s^1$	6,6381	28,5943	4,0519	2,8206	2,8569	2,8555	4,5549	6,1305	6,0329	3,8964	1,0658		

Anhang

Tab. 47 i: Konzentration an Propionat in mmol/

Prop	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	±s ²	±s ³
\bar{x} V1	13,420cdAB	10,299bcA	8,835abcA	5,440aA	6,306abA	k1	17,381dB	9,418abcB	k1	22,955eC	k1	1,9212	
\bar{x} V2	13,998dfB	11,440cdA	10,837cdAB	6,492abA	6,890abA*	6,671*	15,793fB	9,495bcB*	15,883#	12,383cdB	5,994a	1,8580	1,8764
\bar{x} V3	9,414abcA	19,466cA	13,229bcB	10,272abcB	5,797abA*	4,265*#	2,896abA	2,690abA#	0,786°	1,174aA	3,248ab	5,7564	0,9439
±s ¹	1,8204	10,7910	1,2911	0,8179	0,8367	1,1189	2,5573	1,4950	2,0729	2,1385	1,4177		

Tab. 47 j: Konzentration an i-Butyrat in mmol/l

i-But	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	±s ²	±s ³
\bar{x} V1	0,294	0,240	0,217	0,104	0,157	k1	0,092	0,119	k1	0,117	k1		
\bar{x} V2	0,164	0,111	0,239	0,137	0,110*	0,259*	0,099	0,136*	0,070*	0,043	0,088		0,1378
\bar{x} V3	0,081	0,219	0,000	0,108	0,000*	0,314#	0,054	0,053°	0,098+	0,182	0,102		0,0000
±s ¹					0,0775	0,1183		0,1449	0,0316				

Tab. 47 k: Konzentration an n-Butyrat in mmol/l

n-But	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	±s ²	±s ³
\bar{x} V1	3,753bAB	2,473aA	2,829abA	2,256aA	3,576bC	k1	10,895cB	3,761bA	k1	11,980dB	k1	0,4336	
\bar{x} V2	6,058bB	2,856aA	2,272aA	2,113aA	2,361aB	4,230	16,896cC	7,086bA	27,363	21,845dC	6,974b	0,9187	
\bar{x} V3	2,425abA	5,399bcB	2,180abA	1,583aA	1,612aA	1,345	5,054abcA	6,017cA	6,482	5,742bcA	4,759abc	1,8628	
±s ¹	1,0242	0,8871	0,3240	0,4382	0,3050		1,5248	2,2242		2,2488	1,2633		

Anhang

Tab.47 l: Konzentration an i-Valeriat in mmol/l

i-Val	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	$\pm s^2$	$\pm s^3$
\bar{x} V1	0,534eA	0,315dA	0,257cdA	0,124abA	0,177abcA	k1	0,081aB	0,221bcdA	k1	0,221abAB	k1	0,0548	
\bar{x} V2	0,901dA	0,422cA	0,316bcA	0,220abcA	0,148abA	0,124	0,078abB	0,194abcA	0,092	0,138abB	0,000a	0,1342	
\bar{x} V3	0,479bA	0,861cB	0,229aA	0,119aA	0,080aA	0,135	0,006aA	0,022aA	0,006	0,025aA	0,032a	0,1140	
$\pm s^1$	0,2098	0,1517	0,1378	0,0775	0,1049		0,0000	0,1183		0,0447	0,0000		

Tab. 47 m: Konzentration an n-Valeriat in mmol/l

n-Val	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	$\pm s^2$	$\pm s^3$
\bar{x} V1	0,294aA	0,377abA	0,750bB	0,728abB	1,296cC	k1	10,100eC	2,418dB	k1	10,449eC	k1	0,1844	
\bar{x} V2	0,665aA	0,307aA	0,338aA	0,474aAB	0,571aB	0,666	1,385bB	1,823bcB	3,617	4,230eB	2,072c	0,2569	
\bar{x} V3	0,246abA	0,696bcA	0,302abA	0,164aA	0,137aA	0,209	0,140aA	0,877cA	0,964	0,974cdA	1,431d	0,2702	
$\pm s^1$	0,2950	0,2366	0,0447	0,1643	0,1817		0,2214	0,2811		0,4123	0,2569		

Tab.47 n: Konzentration an n-Capronat in mmol/l

n-Cap	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	$\pm s^2$	$\pm s^3$
\bar{x} V1	0,009aA	0,012aA	0,075aA	0,016aA	0,154aA	k1	0,650bB	0,179aA	k1	0,944cA	k1	0,1265	
\bar{x} V2	0,005aA	0,000aA	0,026aA	0,047aA	0,069aA	0,269	0,981bB	1,687cAB	4,169	6,240eB	3,438d	0,3362	
\bar{x} V3	0,000aA	0,016aA	0,000aA	0,008aA	0,027aA	0,076	0,128aA	2,445bB	1,578	2,389bA	4,082c	0,7969	
$\pm s^1$	0,0000	0,0000	0,0548	0,0548	0,1265		0,1975	0,8967		0,8432	1,1942		

Anhang

Tab.47 o: Azetat-Propionat-Quotient

A:P	T1	T2	T3	T4	T5	T5,5	T6	T7	T7,5	T8	T9	±s ²	±s ³
\bar{x} V1	2,264dA	1,769bcA	1,789bcA	1,835bcA	2,047cdA	k1	0,916aA	1,549bA	k1	0,967aA	k1	0,1612	
\bar{x} V2	2,449fA	1,795dA	1,515cdB	2,145eB	2,325efA*	1,818#	0,553aA	1,348cA°	0,582+	0,877bA	1,636d	0,1581	0,1761
\bar{x} V3	2,347abA	1,593aA	1,461aB	1,618aA	2,284abA*	2,888*	4,307cB	5,300cB*	6,153*	2,176abB	3,586bc	0,9747	2,1014
±s ¹	0,1581	0,0949	0,0548	0,1342	0,2408	0,2739	0,4648	1,4036	2,5120	0,1817	1,0296		

k1 keine Datenerhebung; kein posthoc-Test in Spalte, da < 3 Gruppen

abc Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte (p < 0,05) innerhalb 24-Stunden-Intervallen in einer Zeile

#°+ Werte mit unterschiedlichen Symbolen kennzeichnen signifikante Effekte (p < 0,05) innerhalb 12-Stunden-Intervallen in einer Zeile

ABC Werte mit unterschiedlichen Großbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte (p < 0,05) innerhalb einer Spalte

s Streuungsmaß¹ pro Tag; ² pro Versuch (24-h-Proben); ³ pro Versuch (12-h-Proben); angegeben nur für Parameter mit Wechselwirkung

Tab. 48: Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichung (±s) und Signifikanzen der Parameter der HGT-Studie mit Wechselwirkungen zwischen Versuch (HGT I, HGT II, HGT III) und Substrat berechnet durch 1-faktorielle (Blindwerte) oder multifaktorielle (Substrate, Versuche) Varianzanalyse

Tab. 48 a: pH-Wert

pH	BW fest	BW flüssig	BW H	BW R	fest H	fest H + R	flüssig H	flüssig H + R	±s ²
\bar{x} HGT I	7,10 eB	6,83 cA	7,00 dA	7,07 eA	6,97 dB	6,93 dB	6,79 bA	6,73 aA	0,000
\bar{x} HGT II	6,96 dA	6,95 dB	7,00 eA	7,10 fB	6,87 cA	6,84 bA	6,82 bB	6,77 aB	0,000
\bar{x} HGT III	7,29 cC	7,19 bC	7,18 bB	7,31 cC	7,32 cC	7,21 bC	7,17 bC	7,11 aC	0,032
±s ¹	0,000	0,032	0,000	0,000	0,045	0,000	0,000	0,000	

Anhang

Tab. 48 b: Konzentration an D-Laktat in mmol/l

D-Lak	BW fest	BW flüssig	BW H	BW R	fest H	fest H + R	flüssig H	flüssig H + R	±S ²
\bar{x} HGT I	0,042 bcB	0,019 abA	0,064 cA	0,001 aA	0,041 bcAB	0,066 cB	0,024 abA	0,028 abB	0,0000
\bar{x} HGT II	0,002 aA	0,002 aA	0,169 bB	0,000 aA	0,006 aA	0,005 aA	0,010 aA	0,001 aA	0,0000
\bar{x} HGT III	0,090 cC	0,109 cB	0,041 abA	0,018 aB	0,067 bcB	0,069 bcB	0,084 bcB	0,073 bcC	0,0000
±S ¹	0,0000	0,0000	0,0316	0,0000	0,0316	0,0083	0,0000	0,0063	

Tab. 48 c: Konzentration an Gesamtlaktat in mmol/l

Gesamtlak	BW fest	BW flüssig	BW H	BW R	fest H	fest H + R	flüssig H	flüssig H + R	±S ²
\bar{x} HGT I	0,121 aB	0,055 aA	0,683 bA	0,001 aA	0,073 aB	0,098 aB	0,046 aA	0,063 aA	0,2530
\bar{x} HGT II	0,030 aA	0,023 aA	1,341 bA	0,020 aA	0,027 aA	0,049 aA	0,052 aA	0,05 aA	0,0447
\bar{x} HGT III	0,248 bcC	0,294 bcB	0,331 cA	0,046 aA	0,178 bcC	0,205 bcC	0,238 bcB	0,266 bcB	0,0548
±S ¹	0,0000	0,0000	0,5167	0,0000	0,0000	0,0316	0,0447	0,0000	

Tab. 48 d: Konzentration an Ammoniak in mmol/l

NH ₃	BW fest	BW flüssig	BW H	BW R	fest H	fest H + R	flüssig H	flüssig H + R	±S ²
\bar{x} HGT I	15,51 cdA	16,14 dAB	15,18 cdB	13,71 bcA	12,18 abA	11,40 aA	14,05 bcdA	14,93 cdB	1,051
\bar{x} HGT II	19,90 bB	19,03 bB	14,98 aB	14,93 aA	17,95 bcC	17,07 bB	18,46 bB	19,37 bC	1,100
\bar{x} HGT III	14,11 cA	13,91 cA	10,26 aA	10,53 aA	14,25 cB	13,62 cA	13,48 cA	12,25 bA	0,592
±S ¹	0,597	1,395	0,411	1,582	0,602	1,380	0,604	0,423	

Tab. 48 d: Konzentration an Propionat in mmol/l

Prop	BW fest	BW flüssig	BW H	BW R	fest H	fest H + R	flüssig H	flüssig H + R	±S ²
\bar{x} HGT I	4,230 bA	8,913 dB	0,732 aA	0,062 aA	3,794 bA	5,954 cB	11,622 eA	13,119 fB	0,5992
\bar{x} HGT II	5,179 bA	9,106 cdB	0,213 aA	0,048 aA	7,859 cB	10,185b deC	10,883 eA	12,774 fB	0,6979
\bar{x} HGT III	3,189 abA	5,018 bcA	0,165 aA	0,807 aA	3,122 abA	3,919 abcA	9,222 dA	6,997 cdA	1,6730
±S ¹	0,6877	0,3017	0,3421	0,3464	0,6261	0,6173	2,2276	0,9083	

Anhang

Tab. 48 e: Azetat-Propionat-Quotient

A:P	BW fest	BW flüssig	BW H	BW R	fest H	fest H + R	flüssig H	flüssig H + R	±s ²
\bar{x} HGT I	3,160 dAB	2,605 cdA	5,074 e	1,334 aA	2,358 bcAB	1,969 bA	2,438 bcA	2,249 bcA	0,2846
\bar{x} HGT II	2,497 aA	2,819 aA	7,249 b	2,065 aA	1,985 aA	1,830 aA	2,551 aA	2,397 aA	0,7029
\bar{x} HGT III	3,834 cB	3,381 bB	k2	5,078 dB	2,666 aB	2,593 aB	2,923 aB	2,770 aB	0,2145
±s ¹	0,2569	0,1225	1,7111	0,5089	0,2214	0,0894	0,1378	0,1140	

Tab. 48 f: Konzentration an Methan in µmol/l (rot n=1; daher s nicht möglich)

CH4	BW fest	BW flüssig	BW H	BW R	fest H	fest H + R	flüssig H	flüssig H + R	±s ²
\bar{x} HGT I	k1	756,55	0,00	k1	0,00 A	0,00 A	186,11 B	778,86 A	k1
\bar{x} HGT II	656,45 a	0,00 a	0,00 a	621,49 a	384,59 aA	289,26 aA	1024,94 aC	2422,32 bA	335,682
\bar{x} HGT III	5,27 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	224,44 aA	12,76 aA	120,94 aA	136,04 aA	177,405
±s ¹	k1	k1	k1	k1	288,360	140,588	233,958	500,805	

Tab. 48 g: Nettogasbildung in ml/ 100 mg Substrat

GB/100mg	BW fest	BW flüssig	BW H	BW R	fest H	fest H + R	flüssig H	flüssig H + R	±s ²
\bar{x} HGT I	k1 a	k1 a	1,00 bA	4,93 cB	3,33 bcA	9,58 dB	16,00 eC	16,02 eB	1,200
\bar{x} HGT II	k1 a	k1 a	2,00 bA	0,00 bA	11,33 cB	16,52 dC	11,99 cB	17,31 dB	1,394
\bar{x} HGT III	k1 a	k1 ab	2,99 cdA	0,49 bcA	1,33 cA	5,83 deA	2,00 cA	6,38 eA	1,457
±s ¹			1,155	0,876	1,826	1,251	1,155	1,138	

k1 keine Datenerhebung; kein posthoc-Test, da Abweichung von Stichprobenanzahl n

k2 mathematischer Fehler: Division durch 0

abc Werte mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Zeile

ABC Werte mit unterschiedlichen Großbuchstaben kennzeichnen signifikante Effekte ($p < 0,05$) innerhalb einer Spalte

s Streuungsmaß ¹ pro Substrat und ² pro Versuch

Danksagung

X. Danksagung

Ich bedanke mich von Herzen bei allen Mitarbeitern des Institutes für Tierernährung, Diätetik und Ernährungsschäden der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die kleinen und großen Hilfen. Mein Dank gilt auch den "Helferlein" des Veterinär-Physiologischen Institutes sowie den Mitarbeitern der Rossschlächtereifelgentreff. Vielen Dank den Betreuern des Institutes für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie in Leipzig.

Besonderer Dank gebührt meinen Doktormüttern Prof. Zeyner, für die langjährige und geduldige Betreuung, Prof. Krüger und Prof. Kienzle, für die fachliche Beratung aber auch Prof. Aschenbach, für das Wecken der Leidenschaft am wissenschaftlichen Arbeiten. Vielen Dank!

Die meiste Unterstützung und den Antrieb Durchzuhalten verdanke ich meiner Mutter.

Danke, Mama.....