

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

**Einfluss des Rohproteingehaltes im Futter auf die renalen  
Energieverluste beim Pferd**

von Marleen Kuchler  
aus Dachau

München 2020



**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität  
München**

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

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



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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

**Tag der Promotion:** 25. Juli 2020



*Für meine Familie*





# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Übersichten .....</b>	<b>3</b>
2.1 Abkürzungsverzeichnis .....	3
2.2 Abbildungsverzeichnis .....	5
2.3 Tabellenverzeichnis .....	7
<b>3. Einleitung.....</b>	<b>9</b>
<b>4. Literaturübersicht.....</b>	<b>11</b>
4.1 Energieausscheidung über den Harn bei verschiedenen Haussäugetieren .....	11
4.2 Produkte des tierischen Protein- und Purinstoffwechsels .....	14
4.3 Metaboliten pflanzlicher phenolischer Verbindungen .....	15
4.3.1 Hippursäure .....	15
4.3.2 Phenolische Verbindungen in Pflanzen - Vorläufer der Hippursäure.....	16
<b>5. Publikation.....</b>	<b>21</b>
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>39</b>
6.1 Kritik der Methoden .....	39
6.1.1 Kotgewinnung .....	39
6.1.2 Harngewinnung.....	41
6.1.3 Berechnung der Ergebnisse der Testfuttermittel.....	44
6.2 Diskussion der Ergebnisse.....	47
6.3 Schlussfolgerung .....	50
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>53</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>55</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>65</b>



## 2. Übersichten

### 2.1 Abkürzungsverzeichnis

a.m.	ante meridiem
AA	amino acids
ATP	Adenosintriphosphat
BW	body weight
bzw.	beziehungsweise
CLOV	Kleegras, clover-grass-mix
CP	crude protein
DE	Verdauliche Energie, Digestible Energy
DM	dry matter
e.g.	exempli gratia
et al.	et alii
Fig.	Figure
g	Gramm, gram
GE	Bruttoenergie, Gross Energy
GRASS	frisches Gras, fresh grass
h	hours
HAY1	Heu 1. Schnitt, first cut hay
HAY2	Heu 2. Schnitt, second cut hay
HERBS	Kräuter-Gras-Mix, herbs-grass-mix
i.e.	id est
kg	Kilogramm, kilogram
kJ	Kilojoule, kilojoules
LM	Lebendmasse
max.	maximal, maximum

ME	Umsetzbare Energie, Metabolizable Energy
N	Stickstoff, nitrogen
n	number
NDF	neutral detergent fibre
NDICP	neutral detergent insoluble crude protein
NfE	Stickstofffreie Extraktstoffe, nitrogen-free extracts
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NPN	Nicht-Protein-Stickstoff-Verbindung, non-protein-nitrogen
p.m.	post meridiem
RIBR	Reiskleie, rice bran
Rp	Rohprotein
SBP	Rübenschnitzel, sugar beet pulp
STR	Stroh, straw
Trp	Tryptophan, tryptophan
TS	Trockensubstanz
vRp	verdauliches Rohprotein

## 2.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Energieausscheidung in kJ pro Gramm verdaulichem Rohprotein bei verschiedenen Spezies
- Abb. 2** Strukturformel von Harnstoff
- Abb. 3** Strukturformel von Allantoin
- Abb. 4** Strukturformel von Kreatinin
- Abb. 5** Strukturformeln von p-Cumarsäure, Ferulasäure und Benzoylglycin
- Abb. 6** Bindungen von Ferulasäure und p-Cumarsäure zu anderen Zellwandkomponenten
- Abb. 7** Vergleich der Kotabsatzmengen in g Trockensubstanz pro  $\text{kg}^{0,75}$  LM zwischen den Mittelwerten von Tag und Nacht der verschiedenen Durchgänge
- Abb. 8** Vergleich der Urinmenge in g Frischgewicht pro  $\text{kg}^{0,75}$  LM zwischen den Mittelwerten von Tag und Nacht der verschiedenen Durchgänge
- Abb. 9** Relation des Proteingehaltes in g pro kg TS der Futtermittel und der renalen Energieausscheidung in kJ/g TS im Vergleich der Gesamtrationen und den berechneten Testfuttermitteln mit der Literatur
- Abb. 10** Vergleich der gemessenen renalen Energieverluste der Gesamtrationen mit Gramineae (x; kJ/g Rp-Aufnahme) und der prognostizierten renalen Energieverluste (y; kJ/g Rp-Aufnahme) entsprechend der Gleichung von HIPPEL et al. (2017) für Gramineae

**Abbildungen in der Publikation:**

- Fig. 1** Comparison of measured renal energy excretion in total rations and test ingredients ( $x$ ; kJ/g CP intake) and predicted renal energy excretion ( $y$ ; kJ/g CP intake) according to the equation of Hipp et al. (2017) for grass products.
- Fig. 2** Relationship between crude protein content in feed dry matter and renal energy excretion per g crude protein intake
- Fig. 3** Relationship between crude protein content in feed dry matter ( $x$ ; g/kg DM) and renal energy excretion per g DM intake ( $y$ ; kJ/g DM)

### 2.3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1** Stickstoff, Bruttoenergie (GE) und Bruttoenergie-Stickstoff-Quotient in verschiedenen Verbindungen des Urins
- Tab. 2** Scheinbare Verdaulichkeit der Trockensubstanz, des Rohproteins und der Bruttoenergie von Heu mit verschiedenen Proteingehalten
- Tab. 3** Vergleich der Urinabsatzmengen der gleichen Ponys bei Futtermitteln der eigenen Studie in g pro kg<sup>0,75</sup> LM bei Sammlung über zweimal 12 Stunden mit ähnlichen Futtermitteln vergangener Studien bei Sammlung über 24 Stunden
- Tab. 4** Renale Energie- und N-Ausscheidung bei den verschiedenen Rationen
- Tab. 5** Renal excretion of energy and N in the different rations

#### Tabellen in der Publikation:

- Tab. 1** Dry matter (DM) intake, DM content and nutrient composition of the ration, intake of crude protein (CP) and percentage of non-protein-nitrogen (NPN) and neutral-detergent-insoluble CP (NDICP) of CP and intake of aromatic amino acids
- Tab. 2** Nutrient composition of the test ingredients, percentage DM
- Tab. 3** Apparent digestibility of dry matter (DM), gross energy (GE) and crude protein (CP) in % in total rations and for test ingredients
- Tab. 4** Total daily urine weight, renal excretion of energy and nitrogen (N), calculated renal energy excretion from test ingredient and N Balance
- Tab. 5** Examples for DE and ME content (MJ/kg wet weight) in typical horse feed calculated with the mean protein correction of 8 kJ/g crude protein (GfE 2014) and the new modified equation (Equation 4)





### 3. Einleitung

Die Energieausscheidung beim Pferd über den Urin ist insbesondere im Vergleich mit anderen Säugetierspezies als relativ hoch anzusehen (KIENZLE und ZEYNER 2010). Zur Berechnung der Umsetzbaren Energie (ME) eines Futtermittels müssen diese Verluste berücksichtigt werden. HIPPE et al. (2017) konnten zeigen, dass zur Beurteilung der renalen Energieverluste beim Pferd vor allem die renale Hippursäureausscheidung sowie die renale Stickstoffausscheidung herangezogen werden müssen. Verfügbare Phenolsäuren aus den pflanzlichen Zellwänden werden im Verdauungstrakt freigesetzt, absorbiert und zu Hippursäure metabolisiert. Diese muss schließlich über den Urin ausgeschieden werden. Der Gehalt an den phenolischen Verbindungen in den Pflanzen und die Bioverfügbarkeit im Verdauungstrakt des Tieres können dabei jedoch stark variieren (JUNG und FAHEY, 1983; OESTMANN et al. 1995). Dagegen kann die renale Stickstoffausscheidung mittels der Proteinaufnahme abgeschätzt werden. Der Proteingehalt verschiedener Futtermittel unterscheidet sich häufig aber deutlich. Zudem ist der Effekt bekannt, dass dieser vor allem in Süßgräsern (*Gramineae*) mit dem Alter der Pflanze entsprechend abnimmt (JEROCH et al. 1993).

HIPPE et al. (2017) veranschaulichten, dass es möglich ist, die renalen Energieverluste mittels der Rohproteingehalte der Futtermittel (g pro kg TS) abzuschätzen. Dabei wurde eine Gleichung für *Gramineae* ( $y = 0,0338x^2 - 1,254x + 17,509$ ;  $r^2 = 0,64$ ;  $n = 18$ ,  $p < 0,01$ ) mit dem Rohproteingehalt in der Trockensubstanz (x; g/kg TS) als unabhängige und den renalen Energieverlusten (y; kJ/g Rohproteinaufnahme) als abhängige Variable erstellt.

In der vorliegenden Arbeit sollten weitere Daten zu den renalen Energieverlusten bei der Fütterung von unter anderem verschiedenen Süßgräsern und weiteren pferdetypischen Futtermitteln wie Reiskleie oder Rübenschnitzeln gesammelt werden. Dabei wurde auch oben genannte Gleichung zur Vorhersage von renalen Energieverlusten bei der Fütterung von *Gramineae* von HIPPE et al. (2017) getestet. Ein Ziel der Arbeit war, falls möglich, diese Gleichung auf weitere Futtermittel auszudehnen und gegebenenfalls eine für viele Futtermittel allgemeingültige Gleichung zu formulieren, sodass eine Anpassung des aktuellen GfE-Systems zur Ermittlung der Umsetzbaren Energie (ME) Gehalte von Futtermitteln möglich ist.

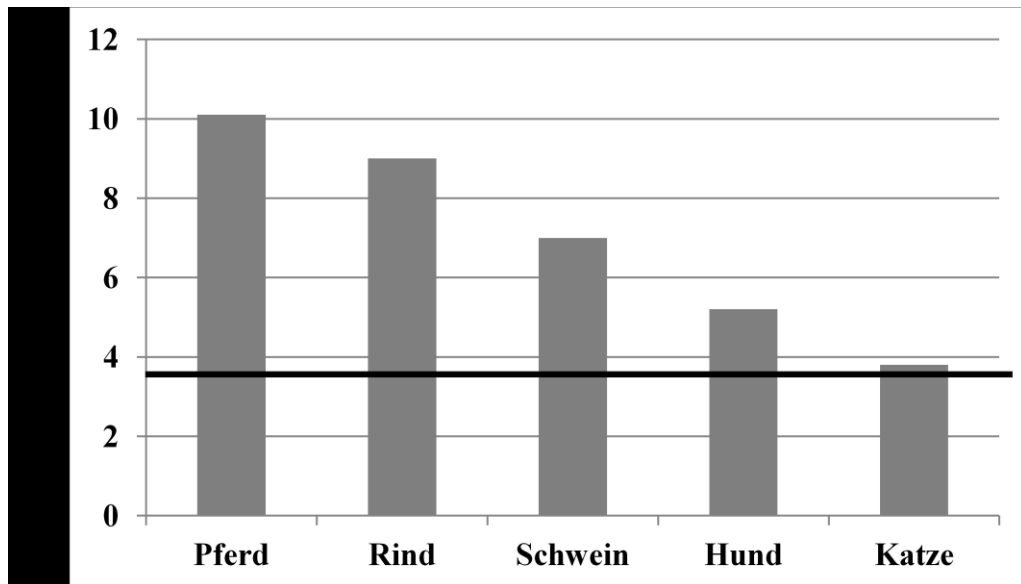
Aktuell werden pauschal Energieverluste für jedes Futtermittel von 8 kJ pro Gramm Rohproteinaufnahme abgezogen (GfE, 2014).

Da in der Studie von HIPP et al. (2017) besonders hohe renale Energieverluste bei der Gabe von frischem Grünfütter aufgetreten sind, war ein weiteres Augenmerk der Arbeit, verschiedene frische Grünfütter (frisches Gras, Klee gras, Kräuter-Gras-Mix) hinsichtlich ihres Effekts auf die renale Energieausscheidung beim Pferd zu bewerten.

## **4. Literaturübersicht**

### **4.1 Energieausscheidung über den Harn bei verschiedenen Haussäugetieren**

„Die umsetzbare Energie pro g verdaulichem Rohprotein ist abhängig von der Tierart. Die Unterschiede zwischen den Tierarten sind einmal auf die Methanbildung bei Wiederkäuern, zum anderen auf abweichende Energieausscheidungen im Harn zurückzuführen“ (SCHIEMANN 1972). Schon lange ist bekannt, dass die Rohproteinaufnahme einen Einfluss auf die Energieausscheidung über den Harn hat. Geht man nun den Schritt von der Verdaulichen Energie (DE) zur Umsetzbaren Energie (ME), um die Energie zu bestimmen, welche dem Tier tatsächlich für Stoffwechselprozesse zur Verfügung steht, müssen Verluste über einerseits Gärgase und andererseits energiereiche N-haltige Metaboliten im Harn berücksichtigt werden (KAMPHUES et al. 2014). Im Vergleich zum Wiederkäuer sind die Energieverluste über Methan beim Pferd, bedingt durch die mikrobielle Gasproduktion im Dickdarm, deutlich geringer. Die renalen Energieverluste sind dagegen im Vergleich mit anderen Spezies als recht hoch anzusehen und variieren zwischen 7 und 12 % der verdaulichen Energie (KIENZLE und ZEYNER 2010). Beim Rind gehen beispielweise rund 6,7 % der DE über den Harn verloren (HOFFMANN 1972). Betrachtet man nun bei verschiedenen Spezies die Energieausscheidung über den Harn bezogen auf die Aufnahme an verdaulichem Rohprotein (vRp) ergibt sich folgendes Bild:



**Abb. 1:** Energieausscheidung in kJ pro Gramm verdaulichem Rohprotein bei verschiedenen Spezies (KIENZLE und ZEYNER 2010, HOFFMANN und KLEIN 1980, NRC 2006, HASHIMOTO et al. 1995);

— rechnerischer Verlust (3,67 kJ/g vRp), wenn Stickstoff ausschließlich als Harnstoff ausgeschieden wird

Die hohen Energieverluste pro g vRp bei den herbivoren Rindern und Pferden, lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass neben Harnstoff und weiteren Metaboliten des Protein- und Purinstoffwechsels auch Entgiftungsprodukte phenolischer Verbindungen über den Harn ausgeschieden werden (VON ENGELHARDT 2015). Würde man davon ausgehen, dass alles an Stickstoff beim Pferd als Harnstoff ausgeschieden wird, würden sich Verluste von 3,67 kJ/g vRp ergeben (KIENZLE und ZEYNER 2010, vgl. Abb. 1). Dieser Wert ist vergleichbar mit den Energieverlusten bei der carnivoren Katze, welche vornehmlich Harnstoff ausscheidet (HASHIMOTO et al. 1995). Um die Energieverluste über den Harn beim Pferd richtig einschätzen zu können, müssen einerseits die Produkte des tierischen Protein- und Purinstoffwechsel, andererseits Metaboliten pflanzlicher phenolischer Verbindungen betrachtet werden. Da diese N-haltigen Verbindungen energiereich sind, tragen sie zu den Energieverlusten bei. Dabei macht Harnstoff bei diesen energiereichen N-haltigen Substanzen als Endprodukt des Protein- und Aminosäurenstoffwechsels bei den Säugetieren mengenmäßig den größten Anteil im Harn aus. Bei Pflanzenfressern folgt nach dem Harnstoff direkt die Hippursäure und stellt somit als Entgiftungsprodukt der Benzoesäure aus dem Magen-Darm-Trakt die zweitgrößte Gruppe dieser Verbindungen dar. Es folgen Kreatinin als Abbauprodukt von Kreatin und Allantoin

als Abbauprodukt des Purinstoffwechsels (VON ENGELHARDT 2015). Tabelle 1 zeigt die Stickstoff- und Energiegehalte sowie den Energie-Stickstoff-Quotienten dieser N-haltigen Verbindungen.

**Tab. 1:** Stickstoff, Bruttoenergie (GE) und Bruttoenergie-Stickstoff-Quotient in verschiedenen Verbindungen des Urins (modifiziert nach NEHRING 1972)

<b>Verbindung</b>	<b>N (g/kg)</b>	<b>GE (kJ/g)</b>	<b>GE/N (kJ/g)</b>
<b>Produkte des tierischen Protein- und Purinstoffwechsels</b>			
<b>Harnstoff</b>	462	10,6	22,9
<b>Allantoin</b>	354	10,5	29,7
<b>Kreatinin</b>	372	20,9	56,2
<b>Metaboliten pflanzlicher phenolischer Verbindungen</b>			
<b>Hippursäure</b>	78	23,7	303,8

Wie man der Tabelle 1 entnehmen kann, enthält Harnstoff den mengenmäßig höchsten Anteil an Stickstoff, ist dabei aber vergleichsweise energiearm. Wird Stickstoff als Hippursäure ausgeschieden und nicht als Harnstoff, sind die renalen Energieverluste pro g N 13 Mal höher. Folglich muss der Aufnahme phenolischer Verbindungen und der daraus resultierenden Hippursäureausscheidung über den Harn erhöhte Aufmerksamkeit geboten werden, wenn die renalen Energieverluste pro g N betrachtet werden. Dies erklärt, warum die renalen Energieverluste pro g vRp bei den herbivoren Spezies deutlich höher sind, da der ausgeschiedene Stickstoff nicht nur bedingt durch die Rohproteinaufnahme ist, sondern auch durch die Aufnahme phenolischer Verbindungen. KIENZLE et al. (2009) konnten zeigen, dass sich bei einer heurichten Ration im Vergleich mit einer haferbetonten Ration höhere renale Energieverluste pro g vRp ergaben, was diese Annahme bestätigt. Bei proteinreichen Rationen und gleichbleibendem Gehalt an phenolischen Verbindungen ist das Verhältnis von Energie zu Stickstoff verringert, da verhältnismäßig wenig Energie pro Stickstoff ausgeschieden wird, aufgrund der vermehrten Ausscheidung von Stickstoff in Form von Harnstoff (NEHRING 1972).

## 4.2 Produkte des tierischen Protein- und Purinstoffwechsels

### Harnstoff

Bei Harnstoff (lat. *urea*) handelt es sich um ein harnpflichtiges Stoffwechselprodukt, welches beim Abbau von Proteinen und Aminosäuren entsteht und mit dem Urin ausgeschieden wird.

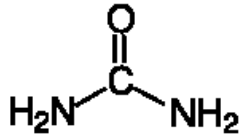


Abb. 2: Strukturformel von Harnstoff

Durch Desaminierung wird die Aminogruppe einer Aminosäure als Ammoniak (NH<sub>3</sub>) abgespalten oder freigesetzt. Dieser durch den Aminosäureabbau entstandene Ammoniak wird in der Leber im Harnstoffzyklus durch die Bildung von Harnstoff entgiftet. Es handelt sich um einen energiereichen Prozess, da zwei Adenosintriphosphate (ATP) verbraucht werden. Der wasserlösliche Harnstoff wird anschließend zur Niere transportiert und über den Urin ausgeschieden. Liegt ein Proteinüberschuss über das Futter vor, kommt es folglich auch zur vermehrten Synthese und Ausscheidung von Harnstoff. (VON ENGELHARDT 2015, STRYER 2017).

### Allantoin

Bei Allantoin handelt es sich um das Abbauprodukt der Nukleotide Adenin und Guanin. Diese beiden Purinbasen werden zunächst zu Harnsäure umgewandelt und bei den meisten Säugetieren wie auch beim Pferd mittels des Enzyms Uricase größtenteils zum wasserlöslichen Allantoin abgebaut und über den Harn abgegeben (VON ENGELHARDT 2015).

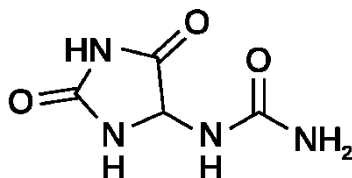
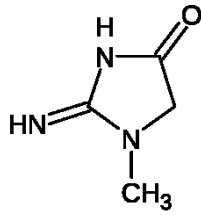


Abb. 3: Strukturformel von Allantoin

### Kreatinin

Kreatinin, als Abbauprodukt aus dem Muskelstoffwechsel, wird aus Kreatin gebildet und relativ konstant ausgeschieden. Die Ausscheidungsrate hängt dabei von Faktoren wie der Muskelmasse, dem Alter und der körperlichen Aktivität ab. Kreatinin wird

somit auch über die Nieren und schließlich den Urin ausgeschieden (VON ENGELHARDT 2015).

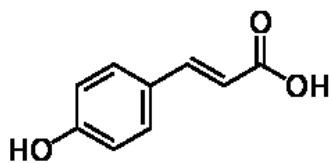


**Abb. 4:** Strukturformel von Kreatinin

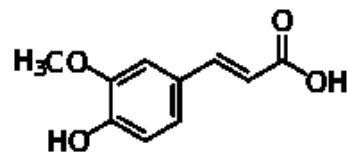
### 4.3 Metaboliten pflanzlicher phenolischer Verbindungen

#### 4.3.1 Hippursäure

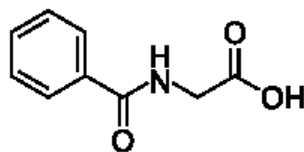
Die Hippursäure (gr. *hippos* = Pferd), welche das erste Mal aus Pferdeurin isoliert wurde und weshalb sich ihr Name hiervon ableitet, kommt insbesondere bei Herbivoren in hohen Konzentrationen im Harn vor (VON ENGELHARDT 2015). Es handelt sich dabei um ein Entgiftungsprodukt der Benzoesäure aus dem Magen-Darm-Trakt. Herbivoren nehmen bedingt durch die Aufnahme von Pflanzen auch die darin enthaltenen Phenolsäuren auf. Diese phenolischen Metaboliten, wobei den Hydroxycimtsäuren *p*-Cumarsäure und Ferulasäure die größte Bedeutung zukommt, sind als Vorläufer der Hippursäure von Bedeutung (JUNG et al. 1983a). Diese Phenolsäuren aus den Pflanzen werden zu Phenylpropansäure im Darm metabolisiert und schließlich in den Hepatozyten zu Benzoesäure transformiert. Die Benzoesäure muss dann mit Glycin konjugiert werden, damit diese als Benzoylglycin (=Hippursäure) über den Urin ausgeschieden werden kann (FOLEY 1999).



*p*-Cumarsäure



Ferulasäure



Benzoylglycin (Hippursäure)

**Abb. 5:** Strukturformeln von *p*-Cumarsäure, Ferulasäure und Benzoylglycin

Die Hippursäureausscheidung hängt somit von der Aufnahme phenolischer Verbindungen ab, zu welchen neben phenolischen Metaboliten aus den Pflanzen auch die aromatischen Aminosäuren gezählt werden müssen. Zu diesen Aminosäuren gehören Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin (STRYER 2017). In der Arbeit von HIPPEL et al. (2017) war dabei aber die Aufnahme von aromatischen Aminosäuren auf molarer Basis deutlich höher, als die Hippursäureausscheidung. Zudem konnte kein Zusammenhang zwischen der Aufnahme der aromatischen Aminosäuren und der Ausscheidung von Hippursäure festgestellt werden. Dass unter den gegebenen Bedingungen kein Zusammenhang bestand, lässt sich einerseits dadurch erklären, dass aromatische Aminosäuren im Organismus auch als Bestandteile von Proteinen dienen. Zudem können Phenylalanin und Tyrosin im Körper zu Fumarat und Acetoacetat bzw. Tryptophan zu Pyruvat und Acetyl-CoA abgebaut werden. Darüber hinaus dienen sie als Vorläufer für Neurotransmitter und Hormone (STRYER 2017, HORN 2015). Aromatische Aminosäuren können folglich im Körper abgebaut und weiterverarbeitet werden und müssen nicht zwangsweise als Hippursäure ausgeschieden werden.

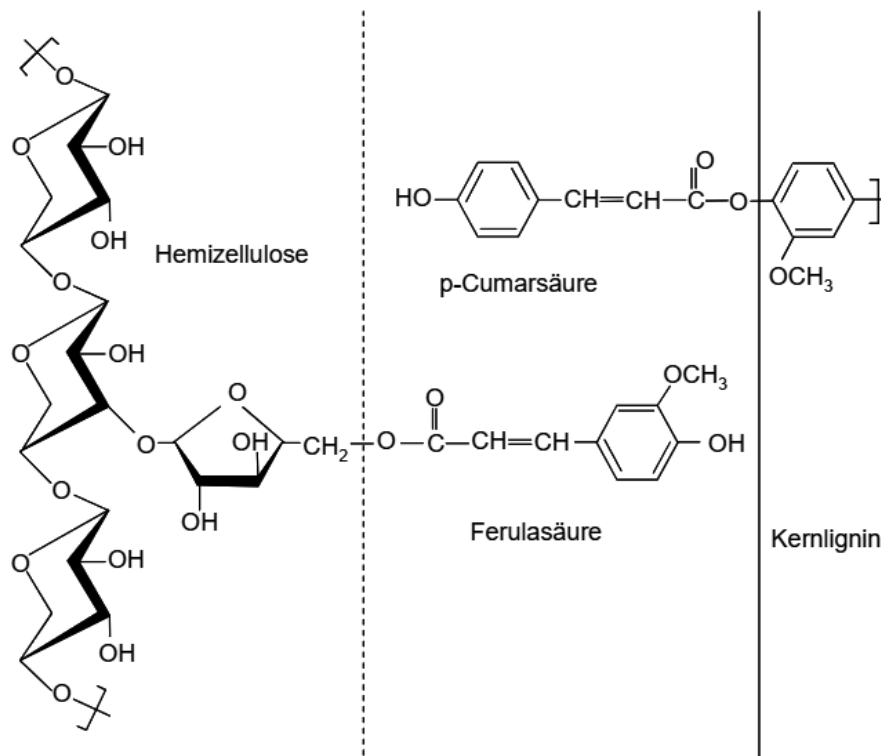
### **4.3.2 Phenolische Verbindungen in Pflanzen - Vorläufer der Hippursäure**

#### **Einteilung und Aufbau**

Bei den Phenolsäuren in Pflanzen handelt es sich um phenolische Verbindungen, welche mit Substanzklassen wie Isoprenoiden Verbindungen (z.B. Glykoside, Carotinoide) oder Alkaloiden (z.B. Koffein) zur Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe gezählt werden. In dieser Gruppe werden verschiedene Pflanzenstoffe zusammengefasst, welche im sekundären Stoffwechsel der Pflanze gebildet werden und beispielsweise als Schutz vor Schädlingen dienen oder als Wachstumsregulator bedeutend sind. Pflanzenprodukte wie Kohlenhydrate, Proteine oder Lipide werden hingegen als primäre Pflanzenstoffe bezeichnet (PAECH 1950). Auch die Bausteine des Lignins, welches eine wichtige Zellwandkomponente in höher entwickelten Pflanzen darstellt, zählen zu den Phenolsäuren. Es handelt sich bei Lignin um ein Mischpolymer, das sich als dreidimensional vernetztes Gitter in die pflanzliche Zellwand einlagert (OESTMANN et al. 1995). Das Lignin in der Zellwand, als Kernlignin bezeichnet, besteht aus einer hochpolymeren und kondensierten Phenylpropanoid-Matrix mit einem hohen Molekulargewicht. Dagegen wird das Nicht-Kernlignin von phenolischen Monomeren, vor allem der p-Cumarsäure und der Ferulasäure gebildet, welche ein nur niedriges Molekulargewicht aufweisen (JUNG



1989, JUNG und DEETZ 1993). Die p-Cumarsäure und die Ferulasäure zählen so neben der Kaffeesäure und der Sinapinsäure zu den wichtigsten Vertretern der Hydroxyzimtsäuren in Pflanzen. Diese werden im Pflanzenstoffwechsel über den Shikimisäure-Weg aus Phenylalanin und Tyrosin gebildet (FAHEY und JUNG 1989). Die p-Cumarsäure ist dabei vor allem mit der Lignin-Fraktion der Zellwände verbunden und die Ferulasäure mit der Hemizellulose-Fraktion. Sie sorgen folglich für eine Quervernetzung der Verbindungen (JUNG 1989, JUNG und DEETZ 1993), was in der Abbildung 6 dargestellt ist.



**Abb. 6:** Bindungen von Ferulasäure und p-Cumarsäure zu anderen Zellwandkomponenten (OESTMANN et al. 1995, nach JUNG 1989)

### Vorkommen

Phenolsäuren kommen ubiquitär in Pflanzen vor. Dabei zeigt sich aber eine große Variation hinsichtlich der Gehalte an Lignin und phenolischen Monomeren in den verschiedenen Pflanzen. Für phenolische Monomere konnten Gehalte von <0,1 bis 4 % in der Trockenmasse gemessen werden, für Lignin Gehalte zwischen 4 und 16 % in den Zellwänden von Gräsern und Leguminosen. Gräser haben niedrigere Ligningehalte bei gleichzeitig höheren Gehalten an phenolischen Monomeren, während Leguminosen höhere Ligningehalte bei niedrigeren Gehalten an phenolischen

Monomeren aufweisen (OESTMANN et al. 1995). JUNG et al. (1983a) konnten in je zwei verschiedenen Gräsern und Leguminosen elf phenolische Monomere bestimmen, wobei der p-Cumarsäure und der Ferulasäure die größte Bedeutung zukam. In den Halmen der Pflanzen ist der Ligningehalt am höchsten, gefolgt von den Blattscheiden und den Blättern. Die Blätter weisen insgesamt nur eine geringe Lignifizierung auf. Somit finden sich auch in den Halmen und Blattscheiden höhere Gehalte an Phenolsäuren im Vergleich zu den Blättern (JUNG und CASLER 1990). Ein gegenteiliges Bild zeigt sich bei der Luzerne, welche mehr Phenolsäuren in den Blättern als im Halm besitzt (TITGEMEYER et al. 1992). Zudem steigt mit der Reife der Gräser der Gehalt der Phenolsäuren, insbesondere der p-Cumarsäure an, nicht aber im gleichem Maße der Gehalt der Ferulasäure, sodass sich mit der Reife ein erweitertes Verhältnis von p-Cumarsäure zu Ferulasäure ergibt (BURITT et al. 1984; IYAMA et al. 1990). Nach JUNG und VOGEL (1986) könnte dies damit zusammenhängen, dass die p-Cumarsäure im Zusammenhang mit dem Lignin steht, welches bei der Pflanzenreife vermehrt gebildet wird, während die Ferulasäure im Zusammenhang mit der Hemizellulose steht, die mit zunehmender Reife nicht vermehrt synthetisiert wird. Bei Luzerne konnte zudem festgestellt werden, dass sich mit der Reife zwar der Ligninanteil erhöht, nicht aber der Gehalt an phenolischen Monomeren (JUNG et al. 1983b). Außerdem konnte JUNG et al. (1983b) zeigen, dass die Konzentration der phenolischen Monomere im Rohrschwengel mit der Reife zunimmt, während der Ligningehalt fast konstant blieb. Neben der Pflanzenspezies kann folglich auch der Erntezeitpunkt den Gehalt an phenolischen Substanzen beeinflussen. Zudem können auch weitere Faktoren wie der Boden oder das Klima eine Ursache für unterschiedliche Gehalte sein (WALD 2003). So zeigten sich bei Pflanzen in warmen Klimaregionen ein höherer Zellwandgehalt und auch höhere Konzentrationen an Phenolsäuren (HARTLEY und MORRISON 1991). Ein Anteil dieser Phenolsäuren (17-80 %) ist in der Zellflüssigkeit gelöst (JUNG et al. 1983b). Es handelt sich somit um eine wasserlösliche Form. Zudem kommen diese als lipidlösliche Komponenten in der Wachsschicht an der Oberfläche der Pflanze vor, sowie bereits erwähnt, gebunden an die pflanzliche Zellwand (CHESSON et al. 1999). Bei Getreiden ist die Ferulasäure die bedeutendste Hydroxyzimtsäure und befindet sich vornehmlich in der Kleie (WATZL und RECHKEMMER 2001). Dabei liegen circa 10 % der Ferulasäure in der Weizenkleie als lösliche Form vor (MANACH et al. 2004).

## **Verfügbarkeit**

Beim Menschen konnte festgestellt werden, dass freie Hydroxyzimtsäuren im Dünndarm absorbiert werden (MANACH et al. 2004; ZHAO et al. 2005, CHESSON et al. 1999). Da die meisten Phenolsäuren allerdings gebunden vorliegen, wird die Verfügbarkeit hierdurch beeinträchtigt. Durch Spaltung der Esterbindungen durch Esterasen im Dünndarm und im Kolon können die Hydroxyzimtsäuren freigesetzt und schließlich aufgenommen werden (BUCHNAN et al. 1996). Nach MANACH et al. (2004) ist die Absorption im Dickdarm beim Menschen aber weniger effizient als im Dünndarm, da weniger Transportsysteme zur Verfügung stehen und die Fläche für den Stoffaustausch geringer ist. Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass Hydroxyzimtsäuren nicht nur passiv über die Enterozyten der intestinalen Schleimhaut aufgenommen werden, sondern auch über einen natriumabhängigen Transport im Bürstensaum des Jejunums (WOLFFRAM et al. 1995). KROON et al. (1997) vermuteten, dass die Freisetzung von Ferulasäuremolekülen zu über 95 % durch Fermentation im Dickdarm erfolgt, da dort erst die gebundenen Moleküle durch Enzyme des Mikrobioms freigesetzt werden können. Auch hinsichtlich der Verfügbarkeit beim Wiederkäuer wurden Untersuchungen vorgenommen. JUNG et al. (1983b) untersuchten von elf phenolischen Verbindungen die *in vitro* Verdaulichkeit durch Zugabe von 1 % einer Fermentationslösung. Dabei konnten nur wenige der phenolischen Verbindungen nach der Fermentation wieder gefunden werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es zu einem Abbau dieser Phenolsäuren durch Mikroben kommt. HARTLEY et al. (1976) beobachteten zudem ebenfalls in einem *in vitro* Fermentationsversuch, dass phenolische Monomeren durch die Zugabe von zellulolytischen Enzymen als lösliche Glykoside freigesetzt werden. JUNG und FAHEY (1983) machten Versuche zur Absorption von Phenolsäuren aus dem Verdauungstrakt von Wiederkäuern und konnten feststellen, dass bei ausgewachsenen Pflanzen weniger aufgenommen wird, als bei jungen Pflanzen. So enthalten ältere Pflanzen zwar mehr phenolische Verbindungen, diese werden aber schlechter vom Tier aufgenommen. Außerdem kann durch den Vorgang der Verdauung die Bindung der phenolischen Monomeren verändert sein und damit natürlich auch die Löslichkeit dieser (JUNG et al. 1983 a). Die vorliegenden Erkenntnisse wurden somit einmal zum Menschen und zur Ratte sowie zum Wiederkäuer gesammelt. CHESSON et al. (1999) nehmen jedoch an, dass die Untersuchungen zu den Vorgängen im Pansen nicht von den Prozessen in anderen Verdauungssystemen abweichen, auch wenn die Stämme der

daran beteiligten Mikroorganismen nicht dieselben sind. Beim Pferd kann davon ausgegangen werden, dass Phenolsäuren im Dünndarm aufgenommen werden können, es aber auch zu einer Fermentation im Dickdarm kommt. Wie hoch der Anteil der im Dünndarm aufgenommenen und wie die Verfügbarkeit der im Dickdarm freigesetzten Phenolsäuren ist, kann aktuell noch nicht abschließend bewertet werden.

## 5. Publikation

Status: Accepted im Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition ©

### **The effect of crude protein content of the diet on renal energy losses in horses**

M. Kuchler<sup>1</sup>, A. Zeyner<sup>2</sup>, A. Susenbeth<sup>3</sup>, E. Kienzle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair of Animal Nutrition and Dietetics, Department of Veterinary Science,  
Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

<sup>2</sup>Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Animal Nutrition Group, Martin  
Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

<sup>3</sup>Institute of Animal Nutrition and Physiology, Christian-Albrechts-University, Kiel,  
Germany

**Running head:** Renal energy excretion of horses

**Keywords:** metabolizable energy, renal energy excretion, energy evaluation, horses

#### **Correspondence:**

Prof. Dr. Ellen Kienzle, Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik,

Veterinärwissenschaftliches Department, LMU München,

Schönleutner Str. 8, D 85764 Oberschleißheim,

Tel.: +49 89 2180 78700; Fax: +49 89 2180 78702;

E-Mail: [kienzle@tiph.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:kienzle@tiph.vetmed.uni-muenchen.de)

## Summary

Renal energy losses of horses are high in comparison to other species. In the present study more data was obtained on this parameter to improve predictive equations for renal energy losses. Four adult ponies (247-344 kg body weight (BW)) were fed with eight different diets based on first cut hay, second cut hay, early first cut fresh grass, late cut herbs-grass-mix, early cut clover-grass-mix, sugar beet pulp, rice bran and straw. Feed intake was measured, urine and faeces were quantitatively collected for 3x12 h at daytime and afterwards 3x12 h at nighttime. Feed was analysed for crude nutrients, gross energy, amino acids and neutral-detergent-insoluble crude protein (NDICP); faeces were analysed for crude nutrients and gross energy; urine was analysed for nitrogen (N) and gross energy. Renal energy losses per gram dry matter (DM) intake ( $y$ ; kJ/g DM) were strictly correlated to protein content in DM ( $x$ ; g/kg DM):  $y = 0.325 + 0.00431x$ ;  $r^2 = 0.81$ ;  $n = 38$ ;  $p < 0.001$ . The data suggests that the intercept represents energy losses by detoxification products such as hippuric acid and the regression coefficient by protein metabolites such as urea.

## Introduction

Renal energy losses in horses are relatively high, when compared to other mammals (Kienzle and Zeyner 2010). Hipp et al. (2017) showed that renal energy losses of horses depend mainly on renal hippuric acid and renal nitrogen excretion. Renal nitrogen excretion is predominantly caused by crude protein (CP) intake. By contrast hippuric acid excretion is less closely related to an individual crude nutrient. Hippuric acid is a metabolite of available phenolic acids from plant cell walls (Jung and Fahey, 1983; Oestmann et al., 1995). However, content and availability of these acids vary considerably. As a general rule their availability is reduced with plant age while their content in dry matter (DM) is increased. Especially in gramineae protein content in DM decreases with plant age (Jeroch et al. 1993). Hipp et al. (2017) demonstrated for gramineae that all three factors are linked together and that renal energy excretion per gram protein intake ( $y$ ; kJ/g crude protein) can be predicted by crude protein content ( $x$ ; g/kg DM) according to the following equation (Equation 1):  $y = 0.034x^2 - 1.254x + 17.509$  ( $r^2 = 0.64$ ;  $n = 18$ ,  $p < 0.01$ ). Such an equation can be used to estimate renal energy losses per g CP and to improve the accuracy of the equation of GfE (GfE, 2014) to calculate the ME value of feeds, where a constant value of 8 kJ/g CP is used. The aim of the present study was to obtain more data for renal energy losses in feeding

gramineae and other feedstuffs and to develop a better verified prediction equation for horse feeds. Since the study of Hipp et al. (2017) showed high values for renal energy excretion in fresh grass, the present study was focused notably on this aspect.

### **Animals, materials and methods**

For the study four adult crossbred ponies (2 geldings, 2 mares: 247-344 kg body weight (BW)) were available. They were fed with eight different test ingredients: first cut hay (HAY1), second cut hay (HAY2), early first cut fresh grass (GRASS), late cut herbs-grass-mix (HERBS), early cut clover-grass-mix (CLOV), sugar beet pulp (SBP), rice bran (RIBR) and straw (STR). HAY1 and HAY2 were fed exclusively and all other feedstuffs were combined with the HAY1 to prevent digestive or behavioural problems. GRASS and CLOV were cut in May, HERBS in August. The herbs-grass-mix contained mainly different herbs like ribwort, dandelion, daisy, stinging nettle and cornflowers, but also small amounts of clover and different grass varieties. During the trial no minerals or other supplements were added. One pony was medicated with Pergolid because of Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID). Food was offered in three meals: at 8 a.m. and 8 p.m. the respective test ingredient and hay, at 3 p.m. only a small amount of hay (max. 0.5 kg) because the ponies were used to a feeding time at the afternoon. Feed intake and diet composition are given in Table 1, nutrient composition of the test ingredients in Table 2. All diets were eaten completely, except of the straw, where two ponies left over between 0.1-0.3 kg per day. Because of colic one pony could not take part in the trial with the straw, so only the results of three ponies could be evaluated. Water was offered free choice.

The trials lasted between 10-16 days depending on the test ingredient and the time for adaptation. For hay the ponies were switched to the test batch and fed this for four days prior to the trial. For green fodder this started with a small amount which was slowly increased. The quantity used in the trial was achieved four days prior collection period. Urine and faeces were collected during the last six days of the trial. For animal welfare reasons the faeces and urine collection was split. The first three days faeces and urine were collected completely during 12 hours of the day, thereafter the same procedure was repeated during 12 hours of the night for three nights. Urine was collected manually with a bucket as described earlier (Goren et al., 2014). During the 12 hours of collection the ponies were kept outside their boxes on rubber mats where

they did not urinate because of splashing. They were allowed to return into their boxes with hemp bedding minimum every four hours. Urine and faeces were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Urine and faeces were analysed as described by Hipp et al. (2017): To determine the gross energy content of urine and faeces bomb calorimetry was used. Nitrogen in urine was determined by the Kjeldahl method (VDLUFA, 2012). Dry matter and crude nutrients and non-protein-nitrogen in feed and faeces were determined according to VDLUFA (2012). Neutral-detergent-insoluble CP (NDICP) was determined according to VDLUFA (2016; method 4.13.1). Feed proteins were hydrolysed with hydrochloric acid and AA were analysed using ion exchange chromatography (Biochrom 30 with PEEK-Sodium Prewash Column,  $100 \times 4.6$  mm, and PEEK-Oxidised Feedstuff Column,  $200 \times 4.6$  mm, Biochrom Ltd., Cambridge, UK) according to the protocol of VDLUFA (2012, method no. 4.11.1). Tryptophan (Trp) was hydrolysed with phosphoric acid and hydrochloric acid and analysed using high performance liquid chromatography (HPLC; Agilent 1100 Series with ZORBAX Eclipse XDB-C8,  $150 \times 4.6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ , Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) according to Fontaine et al. (1998).

The digestibility of the test ingredients were calculated by difference. Renal energy excretions caused by HAY1 were subtracted from total excretions according to its proportion in the diet and the difference attributed to the test ingredient.

The study was approved by the appropriate ethical committee, i.e. the ethical commission of the Veterinary Faculty of the Ludwig-Maximilians-University of Munich, Germany. The authors confirm that they have followed EU standards for the protection of animals used for scientific purposes.

Means and standard deviation were calculated. Comparison of means was carried out after 1-way ANOVA for factor feed by the Holm-Sidak method using the software Sigmastat 3.0 (SPSS). A p-value of  $< 0.05$  was considered significant. Simple linear regressions were calculated to describe a relationship between parameters (Software Sigmastat 3.0 (SPSS)).



## Results

All ponies finally included in the evaluation remained clinically healthy during the trials. One pony had constipation when diet STR was introduced and was excluded from this trial. In the rice bran diet (RIBR) the apparent digestibility of dry matter was low (Table 3) as well in the straw diet (STR). The diet with the early first cut fresh grass (GRASS) had the highest dry matter digestibility. The results for digestibility of dry matter and energy were very similar (Table 3). The highest crude protein digestibility was observed in the herbs-grass-mix (HERBS), the lowest in the straw diet. All diets with fresh green fodder (GRASS, HERBS, CLOV) as well as second cut hay (HAY2) had a high digestibility of crude protein (Table 3).

The total amount of urine was highest in the rice bran diet (RIBR) and lowest in the straw diet (STR) (Table 4). Total renal energy excretion in kJ per kg metabolic BW was highest in the clover-grass-mix diet (CLOV) and lowest in the sugar beet pulp diet (SBP) (Table 4). Renal N excretion in g per kg metabolic BW (Table 4) was highest in HAY1 and lowest in the straw diet (STR). Renal energy excretion in relation to DM intake was highest in the clover-grass-mix diet (CLOV) and lowest in the straw diet (STR). In relation to protein intake the renal energy excretion, however, was highest in the sugar beet pulp diet (SBP) and lowest in the herbs-grass-mix diet (HERBS). This parameter was not only calculated for the mixed rations, but also for the test ingredients and showed a similar ranking (Table 4). The nitrogen balance was not significantly different from zero for all diets (Table 4).

When the equation (Equation 1) of Hipp et al. (2017) was used for the prediction of renal energy excretion per gram crude protein intake in rations containing mainly gramineae (HAY1, HAY2, GRASS, STR), there was a very close correlation between predicted and measured values ( $r^2 = 0.90$ ). When the data for the ingredients which were calculated by difference were included there was still a remarkably good prediction (Figure 1). The same was true for the prediction of renal N excretion from protein intake (data not shown). The relationship between renal excretion of energy per g protein and protein content is shown in Figure 2 (own data). The renal excretion of energy per g DM intake, however, correlated strictly with protein content in DM (Figure 3, own data).

## Discussion

The results of the present study confirm the findings of Hipp et al. (2017) on renal energy excretion in horses. Renal energy losses per g crude protein intake decrease with increasing protein content in the diets. The reason could be that in high protein diets, the renal excretion of hippuric acid, which contains high amounts of energy, decreases in relation to urea excretion, which contains less energy. The present study shows that in general green fodder does not lead to exceptionally high renal energy losses. This is in contrast to the results of Hipp et al. (2017) for fresh grass, which was considered to be an outlier, possibly due to mild diarrhea when the ponies were eating only fresh grass. In the present study diarrhea was avoided by mixing fresh fodder with hay.

The renal energy losses per gram protein intake decreased in the present study with increasing crude protein content. When literature data were included the relationship was clearly non-linear (Figure 2, all data). By contrast, the renal energy losses per g DM intake increased in a linear regression with crude protein content in DM. This was confirmed when literature data were included (Figure 3, all data). The resulting regression equation (Equation 2:  $y = 0.325 + 0.00431x$ ;  $r^2 = 0.81$ ;  $n = 38$ ;  $p < 0.001$ ) with protein content in dry matter ( $x$ ; g/kg DM) as independent and renal energy excretion ( $y$ , kJ/g DM intake) as dependent variable can be used to predict renal energy losses for all diets and feeds tested so far. It is remarkable that the regression coefficient is very close to the renal energy losses per g/CP in dogs (NRC 2006) who excrete very little hippuric acid, and in sheep and cattle (Schiemann et al. 1971). The regression coefficient might represent renal energy losses by urea and other N-containing metabolites such as creatinine and allantoin. The intercept might then represent losses by hippuric acid and other high energy compounds of plant detoxification. Compared to Equation 1 and also compared to a broken line model which could be obtained from the data in figure 2 Equation 2 has practical advantages. The curvilinear model of Equation 1 has its deepest point at a value of around 170 g crude protein content per kg DM and with higher protein content it is no longer valid. The broken line model would result in comparatively large differences in the energy losses per g protein in feed with small differences in protein content, depending on where the protein content is with regard to the breaking point.

Equation 2 can be used to estimate renal energy losses of diets and feedstuffs, which enables to calculate their ME content from their DE content, when methane losses are known. The latter was estimated with 2.0 kJ per g of crude fiber or 2.2 kJ per g acid detergent fiber (Kienzle and Zeyner, 2010).

In line with this the equation of Kienzle and Zeyner (2010) to estimate the DE content

Equation 3: DE (MJ/kg DM) =

$$\begin{aligned}
 & - 3.54 \\
 & + 0.0209 \text{ crude protein} \\
 & + 0.0420 \text{ crude fat} \\
 & + 0.0001 \text{ crude fibre} \\
 & + 0.0185 \text{ N-free extract} \\
 & \text{(crude nutrients in g/kg DM)}
 \end{aligned}$$

can be accordingly modified to estimate the ME content as follows:

Equation 4: ME (MJ/kg DM) =

$$\begin{aligned}
 & - 3.54 - \mathbf{0.325} = - 3.865 \\
 & + (0.0209 - \mathbf{0.0043}) = \mathbf{0.0166} \text{ crude protein} \\
 & + 0.0420 \text{ crude fat} \\
 & + (0.0001 - \mathbf{0.002}) = - \mathbf{0.0019} \text{ crude fibre} \\
 & + 0.0185 \text{ N-free extract}
 \end{aligned}$$

(crude nutrients in g/kg DM; correction for renal losses in bold print, new intercept and new factor for protein in italics)

In Table 5 the estimated DE-values according to Equation 3, estimated ME-values according to GfE (2014), where a constant factor for renal energy excretion with 8 kJ/g crude protein is used, and ME-values estimated according to Equation 4 are presented. This illustrates the importance of a more precise determination for renal energy losses realized with Equation 4.

## References

Fingerling (1931 - 1939) cited from Fingerling 1953 (Fingerling, G., 1953: Der Erhaltungsbedarf der Pferde. In: *Untersuchungen über den Futterwert verschiedener Futtermittel*. Arbeiten aus dem Nachlass von O. Kellner und G. Fingerling. Festschrift anlässlich des 100jährigen Bestehens der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Leipzig-Möckern. Band I (Nehring, K.; Werner, A., eds.), pp. 327-334.), Franke 1954 (Franke, E.-R., 1954: Die Verdaulichkeit verschiedener Futtermittel beim Pferd. Versuchsergebnisse aus dem Nachlass von G. Fingerling. In: *Untersuchungen über den Futterwert verschiedener Futtermittel*. Arbeiten aus dem Nachlass von O. Kellner und G. Fingerling. Festschrift anlässlich des 100jährigen Bestehens der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Leipzig-Möckern. Band II (Nehring, K.; Werner, A., eds.), pp. 441-472.), Nehring and Franke 1956 (Nehring, K.; Franke, E.-R., 1956: Untersuchungen über den Stoff- und Energieumsatz und den Nährwert verschiedener Futtermittel beim Pferd. Versuchsergebnisse aus dem wissenschaftlichen Nachlass von G. Fingerling. In: *Untersuchungen über den Futterwert verschiedener Futtermittel*. Arbeiten aus dem Nachlass von O. Kellner und G. Fingerling. Festschrift anlässlich des 100jährigen Bestehens der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Leipzig-Möckern. Band III (Nehring, K., Hrsg.), 327-334.)

Fontaine, J., Bech-Andersen, S. Butikofer, U., de Froidmont-Görtz, I., 1998: Determination of tryptophan in feed by HPLC-development of an optimal hydrolysis and extraction procedure by the EU Commission DG XII in three international collaborative studies. *Agribioogial Research* **51**, 97-108.

GfE, Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 2014: *Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden, Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere* Nr. 11. DLG-Verlag, Frankfurt/Main, Germany.

Goren, G., Fritz, J., Dillitzer, N., Hipp, B., Kienzle, E. 2014: Fresh and preserved green fodder modify effects of urinary acidifiers on urine pH of horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **98**, 239–245.

Hackl, W., Pieper, B., Pieper, R., Korn, U., Zeyner, A., 2010. Effects of ensiling cereal grains (barley, wheat, triticale and rye) on total and pre-caecal digestibility of proximate nutrients and amino acids in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **94**, 729-735.

Hipp, B.; Südekum K.-H.; Zeyner, A.; Goren, G.; Kienzle, E., 2017: Renal energy excretion of horses depends on renal hippuric acid and nitrogen excretion. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **102**, e380–e386.

Jeroch ,H., Flachowsky, G., Weißbach, F., 1993: Futtermittelkunde. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer Verlag Jena.

Jung, H. G.; Fahey, G. C. Jr., 1983: Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: a review. *Journal of Animal Science* **57**, 206-219.

Kienzle, E.; Berchtold, L.; Zeyner, A., 2009: Effects of hay versus concentrate on urinary energy excretion in horses. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* **18**, 118.

Kienzle, E.; Möllmann, F.; Nater, S.; Wanner, M.; Wichert, B., 2008: Mineral content of hay harvested in Bavarian and Swiss horse farms. Predictive value of cutting time, number of cut, botanical composition, origin and fertilization. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **92**, e712–e717.

Kienzle, E.; Zeyner, A., 2010: The development of a metabolizable energy system for horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **94**, e231–e240.

Meyer, H.; Coenen, M., 2014: *Pferdefütterung*. Enke Verlag, Stuttgart, Germany.

National Research Council NRC, 2006: *Nutrient Requirements of Dogs and Cats*. National Academy Press, Washington, DC.

Oestmann, A.; Südekum, K.-H.; Voigt, K.; Stangassinger, M., 1995: Zur Rolle von Lignin und phenolischen Monomeren in Futtermitteln für Wiederkäuer, I.

Vorkommen, Funktionen und Nachweisverfahren. *Übersichten zur Tierernährung* **23**, 105-131.

Pagan, J. D.; Hintz, H. F., 1986: Equine energetics. I. Relationship between body weight and energy requirements in horses. *Journal of Animal Science* **63**, 815–821.

Ragnarsson, S., 2009: *Digestibility and metabolism in Icelandic horses fed forage-only diets*. Doctoral thesis No. 2009/92, University of Uppsala, Sweden.

Schiemann, R., Jentsch, W., Wittenburg, H., 1971: Zur Abhängigkeit der Verdaulichkeit der Energie und der Nährstoffe von der Höhe der Futteraufnahme und der Rationszusammensetzung bei Milchkühen. *Archiv für Tierernährung* **21:3**, 223-240.

VDLUFA, 2012. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Band III. *Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Germany.

VDLUFA, 2012. 2016: Methode 4.13.1, Bestimmung des Neutral-Detergenzienlöslichen Rohproteins (NDLXP). Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Bd. III. *Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Germany.

Vermorel, M.; Martin-Rosset, W.; Vernet J., 1997a: Energy utilization of twelve forages or mixed diets for maintenance by sport horses. *Livestock Production Science* **47**, 157-167.

Vermorel, M.; Vernet, J.; Martin-Rosset, W., 1997b: Digestive and energy utilisation of two diets by ponies and horses. *Livestock Production Science* **51**, 13-19.

**Table 1:** Dry matter (DM) intake, DM content and nutrient composition of the ration, intake of crude protein (CP) and percentage of non-protein-nitrogen (NPN) and neutral-detergent-insoluble CP (NDICP) of CP and intake of aromatic amino acids

Test ingredient	Acronym	n	DM Intake	Test ingredient	DM of ration	Crude protein	Crude fat	Crude fibre	Crude ash	NfE <sup>2</sup>	NDF <sup>3</sup>	CP Intake	Aromatic amino acid intake	NDICP	NPN
			g/kg BW <sup>0.75</sup>	% of DM	%	% DM						g/kg BW <sup>0.75</sup>	mg/kg BW <sup>0.75</sup>	% CP	
Hay, first cut	HAY1	4	47.3±1.4	100	86	8.3	0.6	33.3	5.5	52.3	66.0	3.9±0.1	276	29.9	7.9
Hay, second cut	HAY2	4	51.3±1.7	100	89	13.7	1.4	35.2	6.3	43.4	61.3	7.0±0.2	490	42.5	17.4
Grass <sup>1</sup>	GRASS	4	51.1±1.5	52	32	11.4	1.2	25.3	7.9	54.2	53.8	5.8±0.2	763	18.8	3.7
Herbs-grass-mix <sup>1</sup>	HERBS	4	71.4±0.7	62	45	11.5	1.2	33.0	7.5	46.8	62.0	8.2±0.1	946	28.3	13.9
Clover-grass-mix <sup>1</sup>	CLOV	4	51.8±1.6	52	29	13.0	1.2	31.5	5.8	48.4	51.1	6.8±0.2	1090	16.5	5.0
Sugar beet pulp <sup>1</sup>	SBP	4	38.2±1.1	35	87	8.3	0.5	28.3	7.5	55.5	58.0	3.2±0.1	251	42.5	8.0
Rice bran <sup>1</sup>	RIBR	4	39.4±1.2	33	90	8.7	1.8	23.2	20.2	46.2	41.4	3.4±0.1	299	24.3	13.2
Straw <sup>1</sup>	STR	3	55.1±1.3	43±6	85	6.0	0.8	38.9	4.4	49.9	74.1	3.3±0.1	203	30.7	7.3

<sup>1</sup>mixed with HAY1<sup>2</sup>NfE nitrogen-free extracts<sup>3</sup>NDF neutral detergent fibre

**Table 2:** Nutrient composition of the test ingredients, percentage DM

<b>Test ingredient</b>	<b>DM</b>	<b>Crude protein</b>	<b>Crude fat</b>	<b>Crude fibre</b>	<b>Crude ash</b>	<b>NfE</b>	<b>NDF</b>	<b>NDICP</b>	<b>Gross energy</b>
	<b>% wet weight</b>	<b>% DM</b>				<b>MJ/kg</b>			
<b>Hay, first cut</b>	86.3	8.3	0.6	33.3	5.5	52.3	66.0	2.5	18.9
<b>Hay, second cut</b>	88.6	13.7	1.4	35.2	6.3	43.4	61.3	5.8	19.0
<b>Grass</b>	20.1	14.1	1.7	18.1	10.1	56.0	42.2	1.8	18.2
<b>Herbs-grass-mix</b>	34.8	13.5	1.6	32.8	8.7	43.4	59.6	3.7	18.3
<b>Clover-grass-mix</b>	18.3	17.4	1.8	29.8	6.1	44.9	38.0	1.9	18.6
<b>Sugar beet pulp</b>	88.3	8.3	0.2	19.4	11.0	61.1	43.1	5.4	16.2
<b>Rice bran</b>	96.3	9.2	3.8	6.8	43.8	36.4	15.8	1.5	12.7
<b>Straw</b>	85.2	2.6	1.0	47.2	2.8	46.4	86.2	0.9	18.3



**Table 3:** Apparent digestibility of dry matter (DM), gross energy (GE) and crude protein (CP) in % in total rations and for test ingredients

Acronym	DM <sup>1</sup>	DM <sup>2</sup>	GE <sup>1</sup>	GE <sup>2</sup>	CP <sup>1</sup>	CP <sup>2</sup>
<b>HAY1</b>	46.5±5.9 <sup>a</sup>	-	46.7±5.3 <sup>ab</sup>	-	61.2±4.9 <sup>ab</sup>	-
<b>HAY2</b>	56.2±4.9 <sup>a</sup>	-	54.7±5.0 <sup>ab</sup>	-	73.0±1.9 <sup>ab</sup>	-
<b>GRASS</b>	60.8±4.9 <sup>a</sup>	73.9±3.8 <sup>a</sup>	61.4±4.6 <sup>b</sup>	75.2±3.7 <sup>a</sup>	70.0±1.7 <sup>ab</sup>	75.5±3.1 <sup>a</sup>
<b>HERBS</b>	54.8±9.0 <sup>a</sup>	59.8±11.6 <sup>ab</sup>	53.5±8.8 <sup>ab</sup>	57.8±11.6 <sup>a</sup>	76.2±3.7 <sup>b</sup>	81.9±4.1 <sup>ab</sup>
<b>CLOV</b>	59.2±6.6 <sup>a</sup>	70.6±8.6 <sup>ab</sup>	60.8±6.3 <sup>b</sup>	72.6±8.1 <sup>a</sup>	73.4±2.2 <sup>ab</sup>	78.6±1.7 <sup>a</sup>
<b>SBP</b>	46.7±9.2 <sup>a</sup>	47.1±20.5 <sup>ab</sup>	47.0±9.1 <sup>ab</sup>	47.4±22.1 <sup>a</sup>	50.1±3.3 <sup>a</sup>	30.2±6.9 <sup>ab</sup>
<b>RIBR</b>	40.5±9.4 <sup>a</sup>	30.6±22.7 <sup>b</sup>	42.1±9.6 <sup>ab</sup>	30.8±28.2 <sup>a</sup>	59.2±3.4 <sup>ab</sup>	56.4±10.3 <sup>ab</sup>
<b>STR</b>	42.0±15.2 <sup>a</sup>	38.2±27.5 <sup>ab</sup>	34.7±17.4 <sup>a</sup>	15.7±37.8 <sup>b</sup>	42.9±17.1 <sup>a</sup>	-33.7±65.9 <sup>b</sup>

Means in the same column not sharing a superscript letter are significantly different ( $p < .05$ ).

<sup>1</sup>total ration

<sup>2</sup>test ingredient (calculated by difference assuming no interaction between compounds of ration)

**Table 4:** Total daily urine weight, renal excretion of energy and nitrogen (N), calculated renal energy excretion from test ingredient and N Balance

Acronym	Total daily urine weight in g/kg BW <sup>0.75</sup>	Renal energy excretion in kJ/kg BW <sup>0.75</sup>	Renal N excretion in g/kg BW <sup>0.75</sup>	Renal energy excretion in kJ/g DM intake	Calculated renal energy excretion from test ingredient <sup>1</sup> in kJ/g DM intake	Renal energy excretion in kJ/g CP intake	Calculated renal energy excretion from test ingredient <sup>1</sup> in kJ/g CP intake	N balance in g/kg BW <sup>0.75</sup>
<b>HAY1</b>	73.0±38.1 <sup>a</sup>	36.4±11.9 <sup>ab</sup>	0.82±0.35 <sup>a</sup>	0.77±0.3 <sup>ab</sup>	-	9.2±2.9 <sup>a</sup>	-	-0.4±0.3 <sup>a</sup>
<b>HAY2</b>	125.4±57.6 <sup>a</sup>	46.7±4.4 <sup>ab</sup>	0.71±0.23 <sup>a</sup>	0.91±0.1 <sup>ab</sup>	-	6.7±0.7 <sup>ab</sup>	-	0.1±0.2 <sup>ab</sup>
<b>GRASS</b>	122.8±47.6 <sup>a</sup>	43.6±7.2 <sup>ab</sup>	0.68±0.09 <sup>a</sup>	0.85±0.2 <sup>ab</sup>	0.54±0.2 <sup>a</sup>	7.4±1.2 <sup>ab</sup>	6.5±1.8 <sup>ab</sup>	0.0±0.2 <sup>ab</sup>
<b>HERBS</b>	86.7±20.5 <sup>a</sup>	45.0±5.3 <sup>ab</sup>	0.58±0.05 <sup>a</sup>	0.63±0.2 <sup>ab</sup>	0.93±0.4 <sup>a</sup>	5.5±0.6 <sup>b</sup>	4.0±0.8 <sup>a</sup>	0.4±0.1 <sup>b</sup>
<b>CLOV</b>	142.0±75.6 <sup>a</sup>	49.2±6.2 <sup>a</sup>	0.67±0.07 <sup>a</sup>	0.93±0.2 <sup>a</sup>	1.07±0.4 <sup>a</sup>	7.2±0.9 <sup>ab</sup>	6.4±1.2 <sup>ab</sup>	0.1±0.2 <sup>ab</sup>
<b>SBP</b>	163.7±38.8 <sup>a</sup>	31.2±5.3 <sup>b</sup>	0.52±0.12 <sup>a</sup>	0.77±0.2 <sup>ab</sup>	0.78±0.5 <sup>a</sup>	9.8±1.6 <sup>a</sup>	11.0±4.3 <sup>bc</sup>	-0.3±0.2 <sup>a</sup>
<b>RIBR</b>	166.7±58.5 <sup>a</sup>	33.0±1.6 <sup>ab</sup>	0.53±0.05 <sup>a</sup>	0.80±0.2 <sup>ab</sup>	0.86±0.4 <sup>a</sup>	9.6±0.3 <sup>a</sup>	10.3±0.8 <sup>bc</sup>	-0.2±0.2 <sup>a</sup>
<b>STR</b>	63.1±33.7 <sup>a</sup>	31.5±6.9 <sup>ab</sup>	0.33±0.07 <sup>a</sup>	0.57±0.2 <sup>b</sup>	0.46±0.4 <sup>a</sup>	9.6±2.0 <sup>a</sup>	9.9±10.9 <sup>c</sup>	-0.1±0.1 <sup>ab</sup>

Means in the same column not sharing a superscript letter are significantly different ( $p < .05$ ).

<sup>1</sup>see Table 1

**Table 5:** Examples for DE and ME content (MJ/kg wet weight) in typical horse feed calculated with the mean protein correction of 8 kJ/g crude protein (GfE 2014) and the new modified equation (Equation 4)

Feed <sup>1</sup>	CP in % DM <sup>1</sup>	DE <sup>3</sup>	ME <sup>4</sup>	ME calculated with Equation 4 <sup>5</sup>
Hay, late first cut, extensive <sup>2</sup>	6.4	7.5	6.5	7.0
Corn	10.5	13.6	12.8	12.9
Oats	12.0	12.1	11.1	11.4
Mixed feed for adult horses	15.9	12.4	11.1	11.5
Hay, second cut	16.3	8.9	7.4	8.0
Grass, early first cut	20.0	1.7	1.4	1.5
Mixed feed for foals	20.5	12.5	11.0	11.4
Linseed meal	43.1	12.0	8.7	10.1
Soy bean meal	51.0	12.4	8.7	10.2

<sup>1</sup>Meyer, Coenen (2014)

<sup>2</sup>unpublished data from Coenen and from Zeyner, Kienzle et al. 2008

<sup>3</sup>DE (MJ/kg DM) =

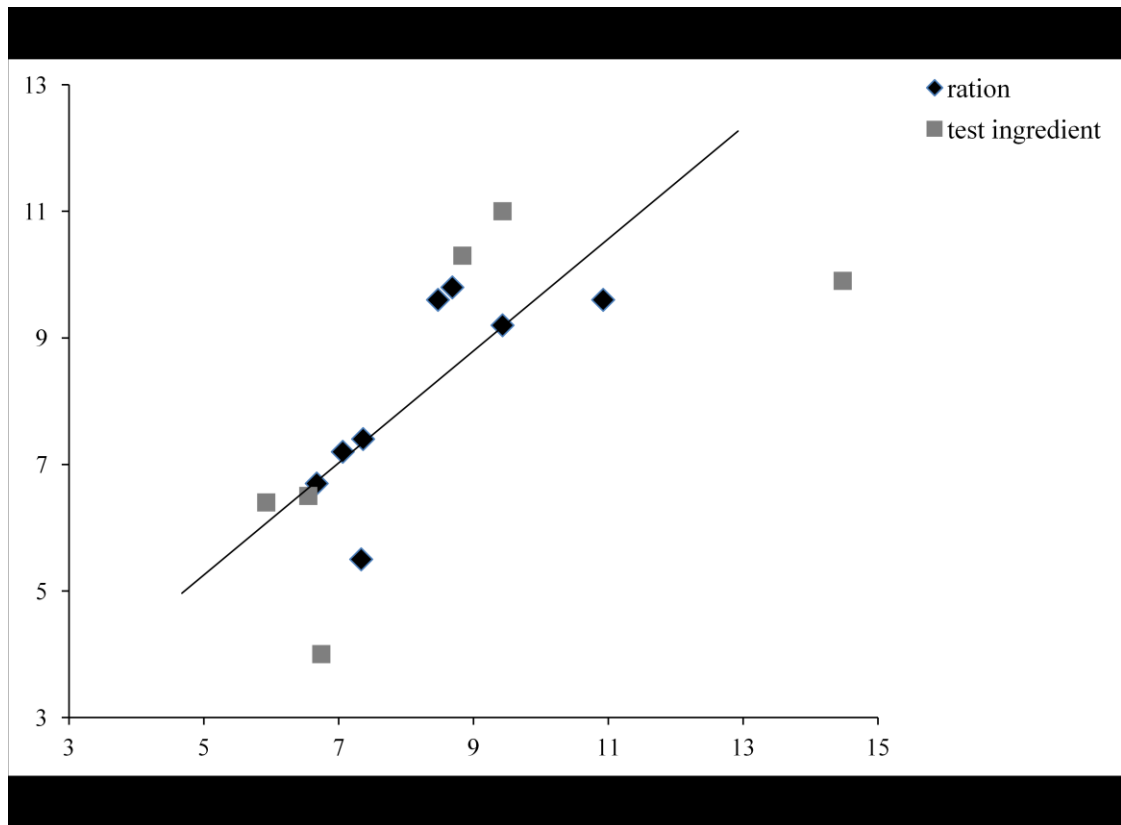
$$-3.54 + 0.0209 \text{ crude protein} + 0.0420 \text{ crude fat} + 0.0001 \text{ crude fibre} + 0.0185 \text{ NfE}$$

<sup>4</sup>ME (MJ/kg DM) =

$$-3.54 + 0.0129 \text{ crude protein} + 0.0420 \text{ crude fat} - 0.0019 \text{ crude fibre} + 0.0185 \text{ NfE}$$

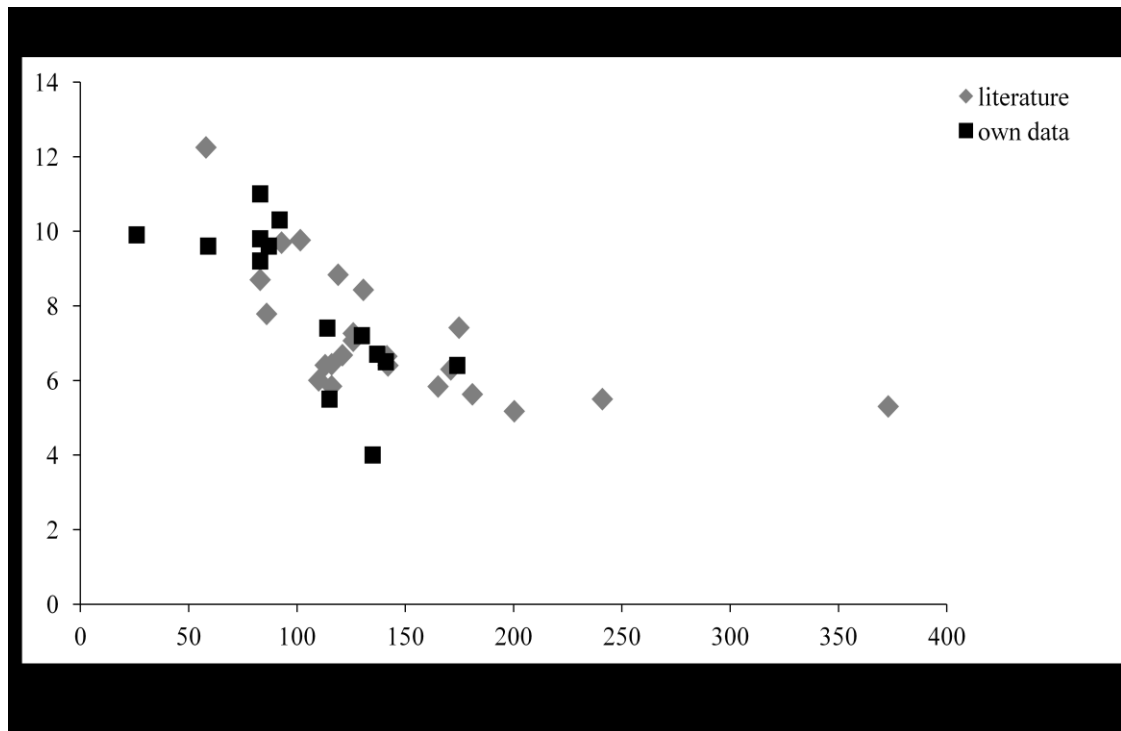
<sup>5</sup>ME (MJ/kg DM) =

$$-3.865 + 0.0166 \text{ crude protein} + 0.0420 \text{ crude fat} - 0.0019 \text{ crude fibre} + 0.0185 \text{ NfE}$$



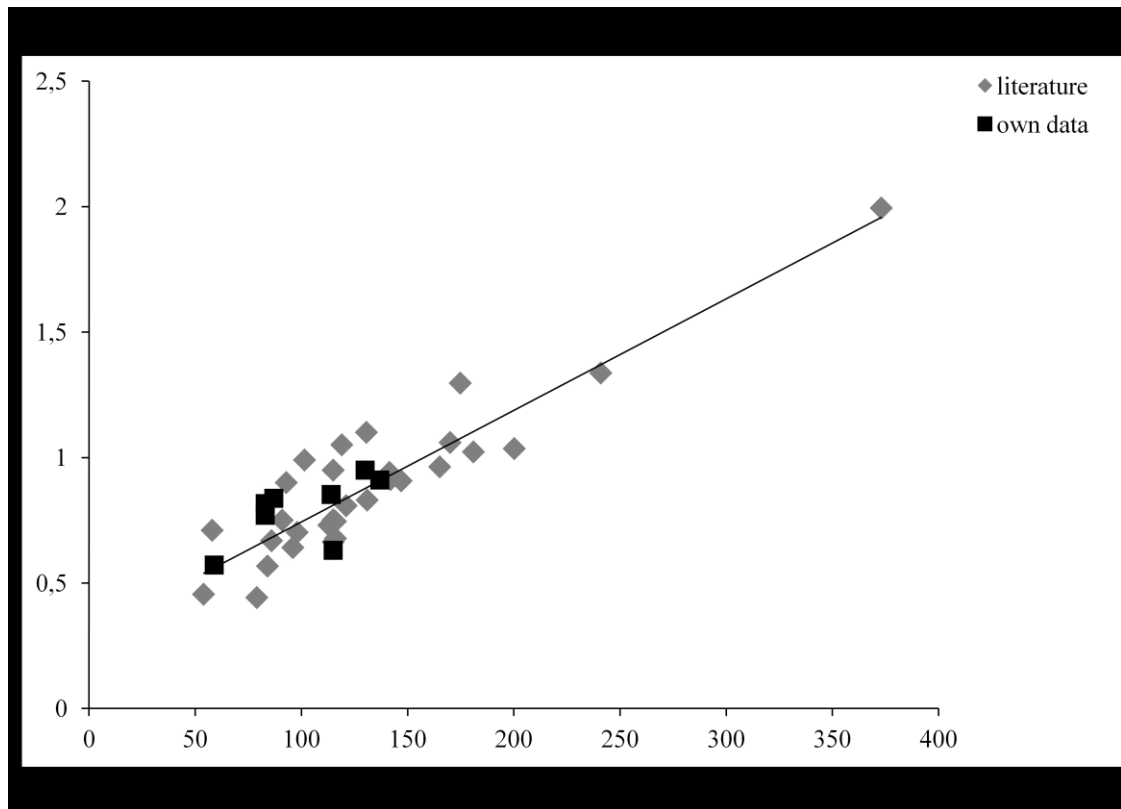
**Figure 1:** Comparison of measured renal energy excretion in total rations and test ingredients (x; kJ/g CP intake) and predicted renal energy excretion (y; kJ/g CP intake) according to the equation of Hipp et al. (2017) for grass products.

$$(y = 0.8859x + 0.8219; r^2 = 0.60; SEM = 1.71; n = 16; p < 0.01)$$



**Figure 2:** Relationship between crude protein content in feed dry matter and renal energy excretion per g crude protein intake (own and literature data: Hipp, et al., 2017; Vermorel, Martin-Rosset, et al., 1997; Vermorel, Vernet, et al., 1997; Kienzle, et al., 2009; Ragnarsson, 2009; Pagan, Hintz, 1986, Fingerling 1931-1939)

An equation was not calculated because it would be a broken line model which is rather impractical for use in a predictive equation.



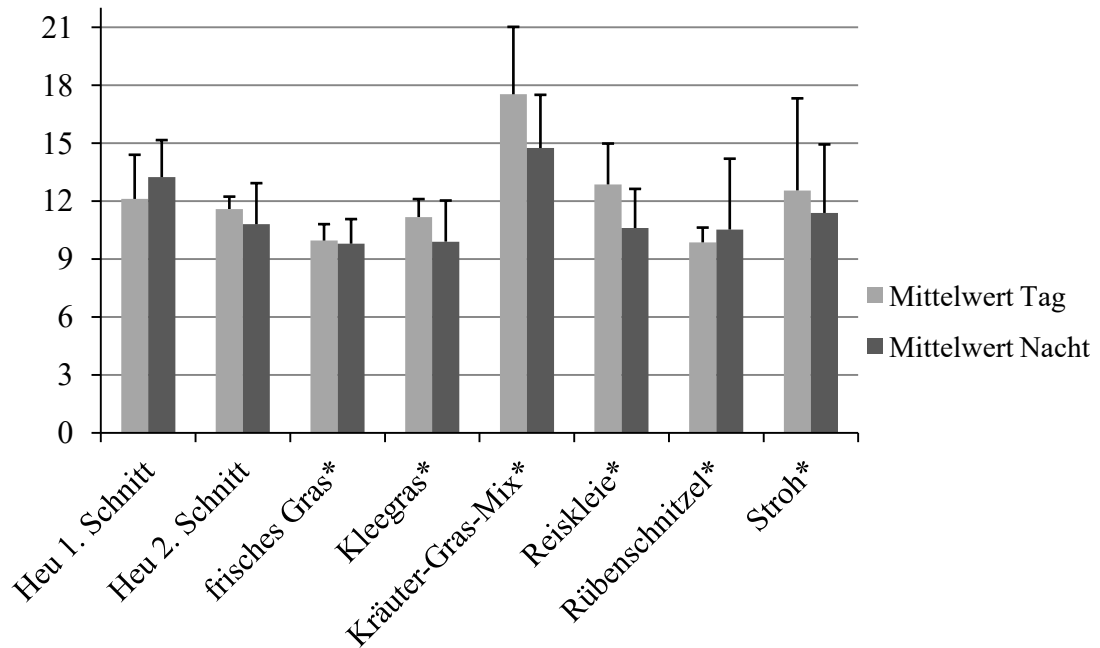
**Figure 3:** Relationship between crude protein content in feed dry matter (x; g/kg DM) and renal energy excretion per g DM intake (y; kJ/g DM) (own and literature data: Hipp, et al., 2017; Vermorel, Martin-Rosset, et al., 1997; Vermorel, Vernet, et al., 1997; Kienzle, et al., 2009; Ragnarsson, 2009; Pagan, Hintz, 1986) ( $y = 0.325 + 0.0043x$ ;  $r^2 = 0.81$ ;  $n = 38$ ;  $p < 0.001$ )

## 6. Diskussion

### 6.1 Kritik der Methoden

#### 6.1.1 Kotgewinnung

Der Kot wurde mittels Kollektionsmethode quantitativ gesammelt, wobei es sich um eine exakte Bestimmungsmöglichkeit der scheinbaren Verdaulichkeit unter relativ pferdegerechten Bedingungen handelt. Aus Tierschutzgründen erfolgte die Sammlungsphase lediglich über 12 Stunden am Tag oder in der Nacht und nicht über 24 Stunden am Stück. So konnte der Stress für die Ponys, welche während der Sammlungsphase außerhalb ihrer Boxen gehalten wurden, möglichst gering gehalten werden. Um eine Verunreinigung des abgesetzten Kotes durch Steine oder andere Naturmaterialien weitestgehend zu vermeiden, wurden die Paddocks mit Gummimatten ausgelegt. Die Ponys wurden engmaschig überwacht, sodass sichergestellt werden konnte, dass der Kot zeitnah nach dem Absatz aufgesammelt und nicht auf dem Paddock verteilt wurde. Auch eine äußere Beeinflussung der Kottrockensubstanz durch die Witterung wie beispielsweise Regen oder starke Sonneneinstrahlung wurde durch das möglichst zeitnahe Aufsammeln vermieden, sodass eine Fehleinschätzung der Verdaulichkeit durch Kotverluste nicht zu erwarten ist. Da jeder Kothaufen einzeln aufgesammelt, gut durchmischt und schließlich jeweils 10 % davon entnommen wurden, war die Gewinnung einer aussagekräftigen Stichprobe gewährleistet. Für die Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeiten wurde die Menge, welche über 12 Stunden am Tag oder in der Nacht abgesetzt wurde, mal zwei genommen, sodass ein errechneter Kotabsatz über 24 Stunden angenommen wurde. Die durchschnittlich abgesetzte Menge an Kot im Frischgewicht betrug in der Nacht  $54,7 \pm 11,4 \text{ g/kg}^{0,75}$  Lebendmasse (LM), am Tag  $60,6 \pm 7,8 \text{ g/kg}^{0,75}$  LM. Bezogen auf die Trockensubstanz in der Nacht  $11,4 \pm 2,5 \text{ g/kg}^{0,75}$  LM und am Tag  $12,2 \pm 1,9 \text{ g/kg}^{0,75}$  LM. Abbildung 7 zeigt den Vergleich der Kotabsatzmengen in der Trockensubstanz in  $\text{g/kg}^{0,75}$  LM zwischen Tag und Nacht im Mittelwert bei den verschiedenen Durchgängen.



\*gemischt mit Heu 1. Schnitt

**Abb. 7:** Vergleich der Kotabsatzmengen in g Trockensubstanz pro kg<sup>0,75</sup> LM zwischen den Mittelwerten von Tag und Nacht der verschiedenen Durchgänge ( $p > 0,05$ )

Es konnte mittels paarigen t-Tests kein signifikanter Unterschied zwischen der Kotabsatzmenge am Tag und in der Nacht festgestellt werden. Es bestand somit kein systematischer Unterschied. Tabelle 2 zeigt eigene Werte im Vergleich mit verschiedenen Studien zu den Verdaulichkeiten von Heu mit unterschiedlichen Proteingehalten.



**Tab. 2:** Scheinbare Verdaulichkeit der Trockensubstanz, des Rohproteins und der Bruttoenergie von Heu mit verschiedenen Proteingehalten

Quelle	Rp-Gehalt des Heus % TS	Verdaulichkeit		
		% TS	% Rp	% GE
<b>Cymbaluk (1990)</b>	7,2	47,5	59,6	46,8
<b>Peiretti et al. (2006)</b>	8,0	48,1	54,7	48,1
<b>Eigene Studie<sup>1</sup></b>	8,3	46,5	61,2	46,7
<b>Moore-Colyer u. Longland (2000)</b>	10,2	48,0	58,0	-
<b>Schiele (2008)</b>	10,5	49,0	62,0	46,0
<b>Eigene Studie<sup>2</sup></b>	13,7	56,2	73,0	54,7
<b>Ordakowski-Burk et al. (2006)</b>	14,4	55,5	48,1	-
<b>Schmidt (1980)</b>	15,5	-	68,6	-

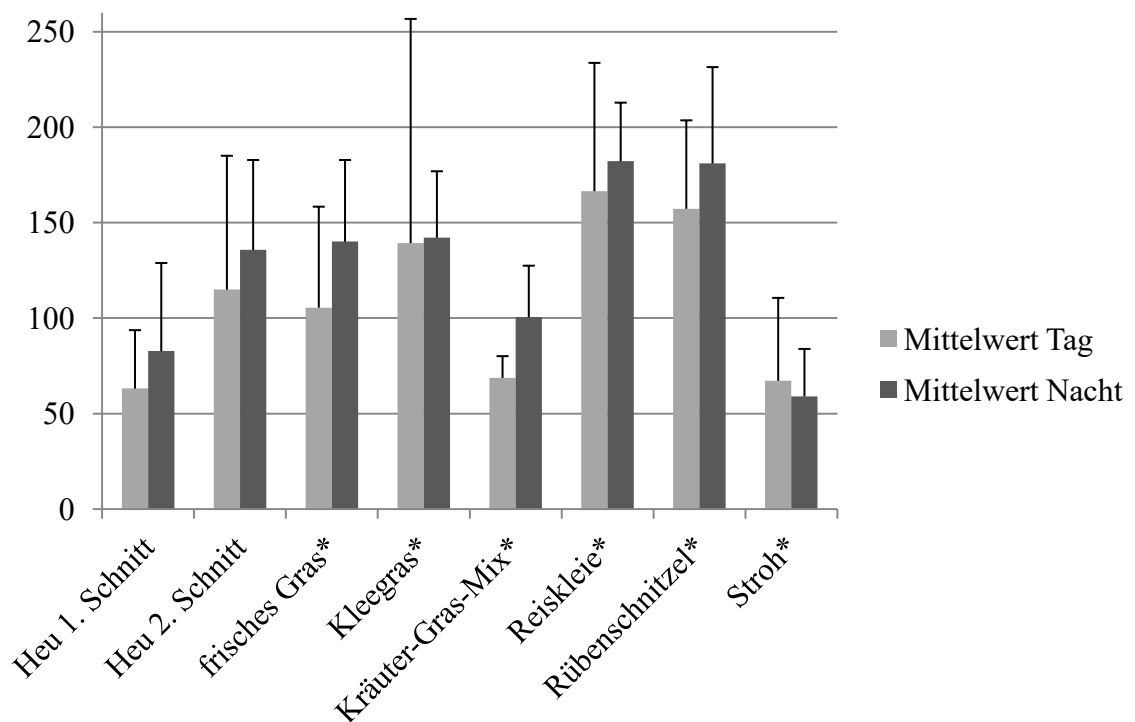
<sup>1</sup>Heu 1.Schnitt

<sup>2</sup>Heu 2. Schnitt

### 6.1.2 Harngewinnung

Die Harngewinnung erfolgte beim spontanen Harnabsatz, da es sich um die schonendste Methode handelt. Die Phase der Sammlung des Urins wurde genau wie die Sammlung des Kotes aus Tierschutzgründen nicht über 24 Stunden am Stück durchgeführt, sondern ebenfalls über 12 Stunden am Tag oder in der Nacht. Während der Sammlungsphase wurden die Ponys außerhalb ihrer Box auf Paddocks mit Gummimatten gehalten, auf welchen sie nur ungern Urin absetzen, da es spritzt. Da die Ponys nach wenigen Stunden wieder in die eingestreute Box gelassen wurden, konnte der Urin in der Regel vollständig aufgesammelt werden. Bereits in vergangenen Dissertationen (SCHIELE 2008; BERCHTHOLD 2009; GOREN 2014) konnte gezeigt werden, dass es sich um eine erfolgreiche Methode zur vollständigen Gewinnung des Urins handelt. Die Ponys wurden im Laufe der Jahre an diese Form der Uringewinnung gewöhnt und wissen, dass sie zum Urinabsatz wieder in die Box geführt werden, weshalb nur selten Urin außerhalb der Box abgesetzt wurde. Wurde Urin dennoch ausnahmsweise spontan auf den Gummimatten abgesetzt, konnte dies sofort erkannt werden und dieser Tag bzw. diese Nacht wurde bei dem entsprechenden Pony bei der Berechnung der Ergebnisse nicht berücksichtigt. Dabei konnte im

Versuchsdurchgang mit frischem Gras eine Nacht bei einem Pony nicht berücksichtigt werden, im Durchgang mit Reiskleie zwei Nächte bei jeweils einem Pony und im Durchgang mit den Rübenschnitzeln drei Tage von drei verschiedenen Ponys. Für weitere Berechnungen wurde die Menge an Urin, welche über 12 Stunden am Tag oder in der Nacht abgesetzt wurde, mal zwei genommen, sodass ein errechneter Urinabsatz über 24 Stunden angenommen wurde. Die durchschnittlich abgesetzte Menge an Urin im Frischgewicht betrug in der Nacht  $129,5 \pm 33,8 \text{ g/kg}^{0,75} \text{ LM}$ , am Tag  $110,8 \pm 48,0 \text{ g/kg}^{0,75} \text{ LM}$ .



\*gemischt mit Heu 1. Schnitt

**Abb. 8:** Vergleich der Urinmenge in g Frischgewicht pro  $\text{kg}^{0,75} \text{ LM}$  zwischen den Mittelwerten von Tag und Nacht der verschiedenen Durchgänge ( $p = 0,01$ )

Vergleicht man die in Abbildung 8 dargestellten abgesetzten Urinmengen am Tag und in der Nacht, lässt sich erkennen, dass diese außer bei dem Durchgang mit Stroh in der Nacht immer höher lag. Im Durchschnitt wurde in der Nacht 17 % mehr Urin ausgeschieden als am Tag. Dies zeigt sich auch im paarigen t-Test als signifikanter Unterschied zwischen der Urinmenge am Tag und in der Nacht. Eine Erklärung für die vermehrte Urinausscheidung in der Nacht könnte sein, dass die Ponys am Tag mehr Wasser aufgenommen haben (mehrmalige Eimerfüllungen waren notwendig, die

Gesamtwassermenge wurde aber nicht quantitativ erfasst), welches dann in der Nacht zu einem erhöhten Urinabsatz geführt hat. Zudem kann hier auch die circadiane Rhythmik des Stoffwechsels einen Einflussfaktor darstellen. Vergleicht man nun in Tabelle 3 die Urinmenge berechnet für 24 Stunden mit Urinmengen aus vorangegangenen Studien, welche eine ähnliche Futterzusammensetzung aufwiesen und mit den gleichen vier Ponys über 24 Stunden am Stück durchgeführt wurden, zeigen sich vergleichbare Werte.

**Tab. 3:** Vergleich der Urinabsatzmengen der gleichen Ponys bei Futtermitteln der eigenen Studie in g pro kg<sup>0,75</sup> LM bei Sammlung über zweimal 12 Stunden mit ähnlichen Futtermitteln vergangener Studien bei Sammlung über 24 Stunden

<b>Futtermittel</b>	<b>Eigene Studie</b>	<b>Hipp et al. (2017)</b>	<b>Schiele (2008)</b>	<b>Stürmer (2005)</b>
<b>Heu</b>	73 <sup>1</sup>		77	72 <sup>2</sup>
<b>Stroh</b>	63	66		
<b>junges Gras</b>	122	144		
<b>Kleegras</b>	142			

<sup>1</sup>Heu 1. Schnitt

<sup>2</sup>12 % Haferanteil

Zudem sind die Ergebnisse der Studie bzgl. der Energie- oder Stickstoffausscheidung vergleichbar mit Werten aus vergangenen Studien, sodass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass die Sammlung über drei Tage und drei Nächte anstelle von dreimal 24 Stunden am Stück keinen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis hat, auch wenn sich die Urinmengen zwischen Tag und Nacht signifikant unterscheiden.

Der Harn wurde vor der Entnahme des Aliquotes für die weitere Analyse gut durchmischt, sodass sichergestellt werden konnte, dass es sich um eine repräsentative Stichprobe handelt und sich keine Partikel am Boden des Sammelbehälters abgesetzt hatten.

### **6.1.3 Berechnung der Ergebnisse der Testfuttermittel**

Nur die beiden Heurationen (Heu 1. und 2. Schnitt) wurden ausschließlich gefüttert. Alle weiteren Rationen enthielten einen Anteil des Heus 1. Schnitt. Die Ergebnisse für die einzelnen Testfuttermittel (frisches Gras, Klee gras, Kräuter-Gras-Mix, Rübenschnitzel, Reiskleie und Stroh) hinsichtlich der Verdaulichkeiten und der Energieausscheidung über den Urin mussten folglich mittels Differenzverfahren berechnet werden. Dabei wurden die gemessenen Ergebnisse vom Heu 1. Schnitt von den gemessenen Ergebnissen der jeweiligen Gesamtausscheidung aus Heu und Testfuttermittel abgezogen. Das Verhältnis des Heus zum Testfuttermittel in der Ration wurde dabei berücksichtigt und die Differenz als Ergebnis dem Testfuttermittel zugeschrieben. Aus praktischer Sicht ist eine andere Art der Ermittlung der Ergebnisse nicht möglich, da Futtermittel wie Reiskleie oder auch Stroh nicht als einziges gefüttert werden können, da es sonst wie bereits beschrieben sowohl zu Verdauungs- als auch Verhaltensstörungen bei den Ponys kommen würde. Aus theoretischer Sicht wird jedoch bei dieser Art der Ergebnisermittlung nicht berücksichtigt, dass zwischen den einzelnen Futtermitteln Interaktionen entstehen können (FEHRLE 1999). Diese können sowohl auf die Verdaulichkeit, als auch auf die Energieausscheidung über den Urin einen Einfluss haben.

### **Scheinbare Verdaulichkeit**

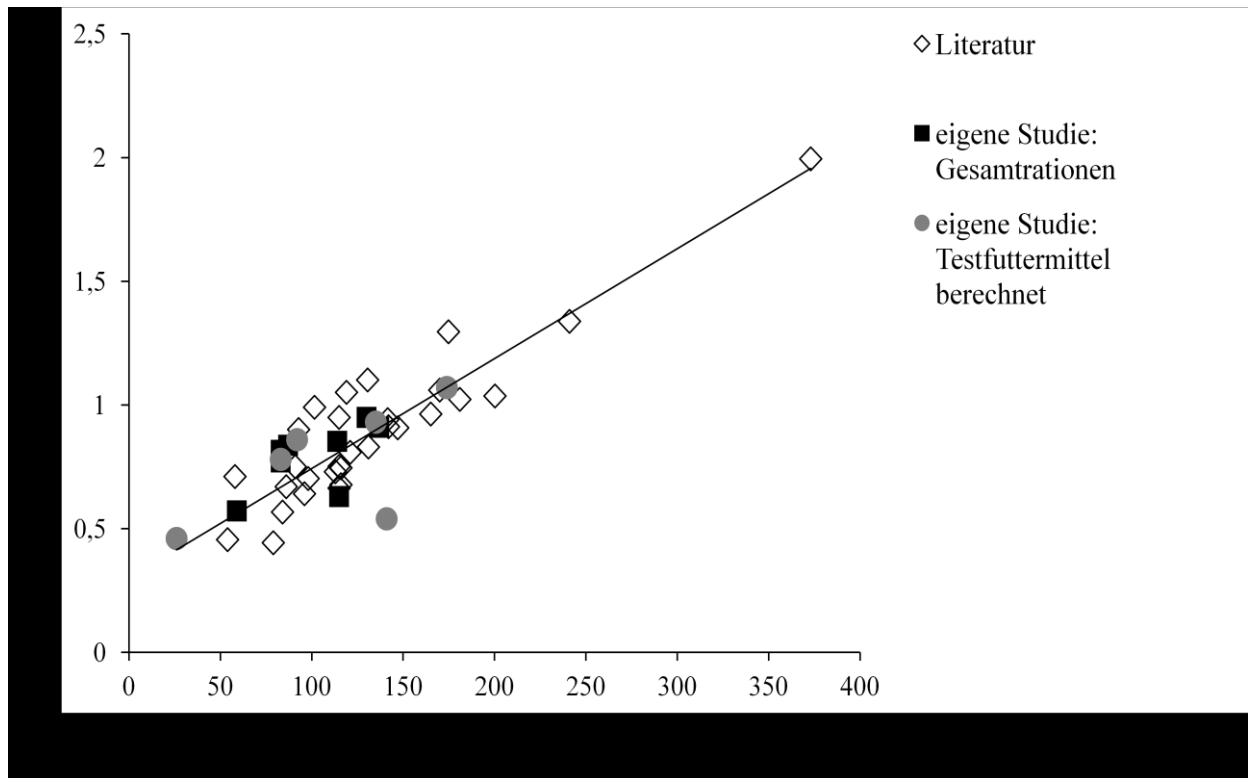
Testfuttermittel können folglich eine schlechtere oder bessere Verdaulichkeit aufweisen, als berechnet. Diese Interaktionen sind insbesondere bei Tierarten, bei denen die mikrobielle Fermentation eine wichtige Rolle bei der Verdauung spielt, von Bedeutung. So sind beispielsweise Fasern aus Stroh weniger verdaulich als Fasern aus Heu. Zudem kann die Faser die Verdaulichkeit anderer Futtermittel herabsetzen (ZEYNER und KIENZLE 2002). FEHRLE (1999) untersuchte die Verdaulichkeit von Mischfuttermitteln in Abhängigkeit von der Raufutteraufnahme. Sie konnte dabei feststellen, dass die scheinbare Verdaulichkeit der TS mit steigendem Rohfasergehalt zurückging. Gleichzeitig zeigte sich, dass die Verdaulichkeit von Stroh durch die Zugabe von Mischfuttermitteln bzw. Grünmehl positiv beeinflusst wurde. Auch LINDEMANN (1982) stellte fest, dass sich die Strohverdaulichkeit durch Zugabe von N-haltigen oder energiereichen Substanzen/Futtermitteln verbessert. Durch die Zugabe von Laktose zur Ration wurde die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe deutlich angehoben. Er erklärte dies mit einem vermehrten Einstrom von praecaecal nicht oder

nur schwer abbaubaren Energieträgern, welche aber im Dickdarm leicht mikrobiell metabolisierbar sind. KARLSSON et al. (2000) zeigten außerdem, dass die Verdaulichkeit von Heu durch Hafer beeinflusst wird, vermutlich durch eine Beeinträchtigung der Verdaulichkeit der Faserbestandteile des Heus. Durch die Zugabe von Trockenschnitzeln (von mindestens 30 % an der Gesamtration) kann die scheinbare Verdaulichkeit von Heu positiv beeinflusst werden (MOORE-COLYER und LONGLAND 2001). Zudem erkannten LINDBERG und KARLSSON (2001), dass es bei der Fütterung von Trockenschnitzeln zu einer verminderten Rohprotein-Verdaulichkeit kommt, im Vergleich zu Rationen mit Hafer. Sie erklärten dies mit einer vermehrten Fermentation von Kohlenhydratverbindungen im Dickdarm und einer damit einhergehenden vermehrten Ausscheidung von mikrobiellem Protein. Das könnte auch das Ergebnis bei der Fütterung von Rübenschnitzeln erklären, in welchem die Proteinverdaulichkeit im Vergleich mit den anderen Futtermitteln geringer ist.

Dies verdeutlicht, dass insbesondere Fasergehalt und die -art in der Ration hinsichtlich der Verdaulichkeit von Bedeutung sind und Interaktionen möglich sind, welche einen Einfluss auf die Verdaulichkeit haben können. Im Differenzverfahren wird jedoch von einer gleichbleibenden Verdaulichkeit ausgegangen. Veränderungen, welche sich in der kombinierten Ration ergeben, werden folglich rechnerisch dem ausdifferenzierenden Futtermittel zugeordnet.

### **Energieausscheidung über den Urin**

Betrachtet man nun die Energieausscheidung über den Urin, scheinen Interaktionen der Futtermittel eine untergeordnete Rolle zu spielen. Abbildung 9 zeigt die Relation des Proteingehaltes in g pro kg TS der Futtermittel und der renalen Energieausscheidung sowohl für die Gesamtrationen der eigenen Studie, als auch für die berechneten Testfuttermittel der eigenen Studie im Vergleich mit den Literaturdaten.



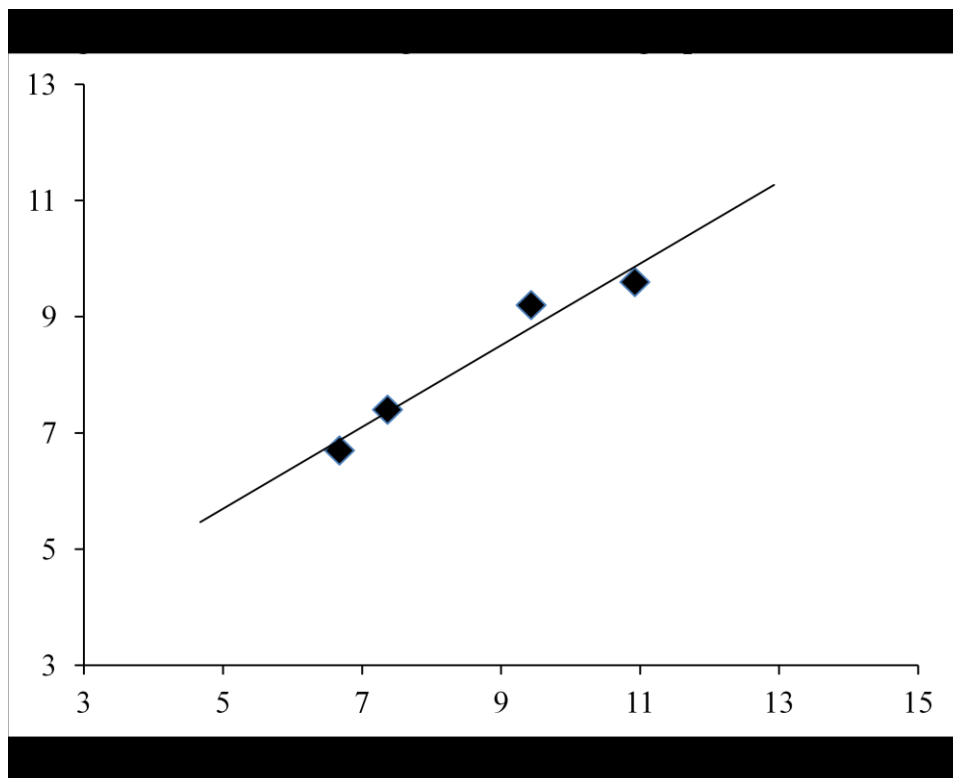
**Abb. 9:** Relation des Proteingehaltes in g pro kg TS der Futtermittel und der renalen Energieausscheidung in kJ/g TS im Vergleich der Gesamtrationen und den berechneten Testfuttermitteln mit der Literatur

Dabei lässt sich feststellen, dass sich die berechneten Werte der Einzelfuttermittel hinsichtlich der renalen Energieausscheidung sehr gut in die Grafik einfügen. Lediglich der berechnete Wert zum frischen Gras weicht etwas von der Trendlinie ab. Die Berechnung der Energieausscheidung über den Urin für die Einzelfuttermittel einer Ration scheint somit anhand des Rohproteingehaltes in der TS möglich zu sein, ohne weitgehende Abweichungen, bedingt durch Interaktionen der Futtermittel.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Studie konnte die Ergebnisse vorangegangener Studien (HIPP et al. 2017, VERMOREL, MARTIN-ROSSET et al. 1997, VERMOREL, VERNET et al. 1997, KIENZLE et al. 2009, RAGNARSSON 2009; PAGAN und HINTZ 1986, FINGERLING 1931-1939) hinsichtlich der renalen Energieverluste beim Pferd bestätigen.

Bisher wurden die renalen Energieverluste des Pferdes in kJ pro g Rohproteinaufnahme berechnet. HIPP et al. (2017) formulierten eine Gleichung für *Gramineae* ( $y = 0,0338x^2 - 1,254x + 17,509$ ;  $r^2 = 0,64$ ;  $n = 18$ ,  $p < 0,01$ ) mit dem Rohproteingehalt in der Trockensubstanz ( $x$ ; g/kg TS) als unabhängige und den renalen Energieverlusten ( $y$ ; kJ/g Rohproteinaufnahme) als abhängige Variabel. Es konnte festgestellt werden, dass sich diese Gleichung für die in der vorliegenden Studie verwendeten Rationen mit *Gramineae* (Heu 1. und 2. Schnitt, frisches Gras und Stroh) sehr gut eignet, um die renalen Energieverluste (kJ/g Rp-Aufnahme) mittels der Rohproteingehalte der Futtermittel (g pro kg TS) vorherzusagen (vgl. Abb. 10).



**Abb. 10:** Vergleich der gemessenen renalen Energieverluste der Gesamtrationen mit *Gramineae* ( $x$ ; kJ/g Rp-Aufnahme) und der prognostizierten renalen Energieverluste ( $y$ ; kJ/g Rp-Aufnahme) entsprechend der Gleichung von HIPP et al. (2017) für *Gramineae* ( $y = 0,7031x + 2,18$ ;  $r^2 = 0,9$ ;  $n = 4$ ,  $p < 0,01$ )

Auch bei der Testung der weiteren Rationen und berechneten Einzelkomponenten aus der vorliegenden Studie, bei welchen es sich nicht um Gramineae handelte, konnten relativ exakte Ergebnisse erzielt werden.

Bezieht man nun alle Daten aus der Literatur (HIPP et al. 2017, VERMOREL, MARTIN-ROSSET et al. 1997, VERMOREL, VERNET et al. 1997, KIENZLE et al. 2009, RAGNARSSON 2009; PAGAN und HINTZ 1986, FINGERLING 1931-1939) sowie die Daten der eigenen Studie ein, zeigt sich, dass sich die renalen Energieverluste pro g Rohproteinaufnahme mit steigendem Rohproteingehalt der Futtermittel verringern. Es besteht somit kein lineares Verhältnis zwischen dem Proteingehalt in der Trockensubstanz des Futtermittels und den renalen Energieverlusten pro g Rohproteinaufnahme, da die Energieverluste pro g Proteinaufnahme über den Urin mit steigendem Proteingehalt abnehmen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich in Rationen, welche einen höheren Gehalt an Rohprotein enthalten, die Ausscheidung von Hippursäure, welche in Relation zum Stickstoff viel Energie enthält (303,8 kJ GE/g N) im Verhältnis zur Ausscheidung von Harnstoff, welcher deutlich weniger Energie pro g Stickstoff enthält (22,9 kJ GE/g N), verringert. Für den Bereich zwischen 6-17 % Rohproteingehalt in der TS der Futtermittel wäre eine Berechnung der renalen Energieverluste mittels einer quadratischen Funktion möglich. Diese ist aber weder für Proteingehalte unter 6 % noch für -gehalte über 17 % geeignet, da es zu einer Über- bzw. Unterschätzung der renalen Energieverluste kommen würde. Folglich ist es wenig praktikabel, den Proteingehalt in der TS in Bezug zu den renalen Energieverlusten in kJ pro g Proteinaufnahme zu stellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass es möglich ist, die renalen Energieverluste in kJ auf die TS-Aufnahme in g zu beziehen und diese in Relation mit dem Proteingehalt in der TS des Futtermittels zu setzen. Daraus ergibt sich eine lineare Regression. Die renalen Energieverluste pro g TS-Aufnahme erhöhen sich somit linear mit dem Proteingehalt in der Trockensubstanz. Es ergibt sich folgende Gleichung:  $y = 0,325 + 0,0043x$  ( $r^2 = 0,81$ ;  $n = 38$ ;  $p < 0,001$ ). Der Proteingehalt in der TS ( $x$ ; g/kg TS) stellt dabei die unabhängige Variabel dar und die renale Energieausscheidung ( $y$ ; kJ/g TS-Aufnahme) die abhängige Variabel. Auffällig bei dieser Gleichung ist, dass der Regressionskoeffizient ähnlich den renalen Verlusten von Hunden ist, welche kaum Hippursäure ausscheiden (NRC 2006). Aus diesem



Grund kann die Annahme getroffen werden, dass der Regressionskoeffizient der Gleichung die renalen Energieverluste über Harnstoff und die weiteren im Stoffwechsel des Tieres anfallenden N-haltigen Substanzen wie Allantoin und Kreatinin abbildet und somit einen Faktor für den N-Stoffwechsel und damit einhergehend der Proteinaufnahme darstellt. Dagegen dürfte das absolute Glied der Regressionsgleichung die Verluste über Produkte der Entgiftung von pflanzlichen Bestandteilen im Körper insbesondere Hippursäure darstellen. Folglich werden in dieser Gleichung sowohl die Proteinaufnahme und die damit verbundene Stickstoffausscheidung berücksichtigt, als auch die Aufnahme der pflanzlichen Phenolsäure und der damit verbundenen Hippursäureausscheidung. Die geringe Streuung um die Regressionsgerade mit Abweichungen von maximal 0,5 kJ/g TS-Aufnahme, legt nahe, dass der Gehalt verfügbarer phenolischer Verbindungen bezogen auf die TS-Aufnahme relativ konstant ist.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Überprüfung der Möglichkeit, dass es bei der Verfütterung von frischem Gras zu erhöhten renalen Energieverlusten kommt. Diese Annahme beruhte auf dem Ergebnis von HIPP et al. (2017), wo sich bei der Verfütterung von frischem Gras im Vergleich mit den weiteren Futtermitteln wie Silage, Stroh oder Heucobs deutlich höhere Energieverluste über den Urin zeigten. Besonders die Ausscheidung der energiereichen Hippursäure war bei der Verfütterung des frischen Grases vergleichsweise hoch. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie frisches junges Gras, ein Kräuter-Gras-Mix und Klee gras verfüttert. Entgegen der Annahme führte die Gabe des frischen Grünfutters jedoch zu keiner erhöhten Energieausscheidung. HIPP et al. (2017) vermuteten, dass die in deren Studie aufgetretenen erhöhten Verluste entweder im Zusammenhang mit einem höheren Anteil an phenolischen Verbindungen stehen könnten, welche aufgrund des kurzen Aufwuchses des Grases auch leichter verfügbar waren (JUNG et al. 1983) oder aufgrund einer veränderten Absorption von Stickstoff bzw. der phenolischen Komponenten aufgrund des Durchfalls, welchen die Ponys während der Verfütterung des Grases zeigten. Eine denkbare Erklärung hierzu wäre eine bedingt durch die Entzündung durchlässigere Darmschleimhaut, wodurch schließlich mehr phenolische Verbindungen aufgenommen werden können. Beim frischen jungen Gras aus der vorliegenden Studie handelte es sich ebenfalls um ein sehr junges Gras. Die Ergebnisse von HIPP et al. (2017) konnten dennoch nicht bestätigt werden. Durch die Zugabe von Heu zu den frischen Grünfütterkomponenten wurden

Verdauungsstörungen wie Durchfall vermieden, sodass die Vermutung von HIPP et al. (2017) gestützt werden kann, dass es sich um eine Fehlmessung aufgrund des Durchfalls der Ponys während des Versuchsdurchgangs handelte und frisches Grünfutter nicht generell zu erhöhten Energieverlusten über den Urin führt.

### 6.3 Schlussfolgerung

Durch die in dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse und insbesondere die Darstellung der renalen Energieverluste in kJ/g TS-Aufnahme in Relation zum Proteingehalt in der TS des Futtermittels, ist es möglich, die bisher gültige Schätzgleichung zur Berechnung der Umsetzbaren Energie (ME) deutlich zu verbessern.

Ausgehend von der Gleichung zur Berechnung der Verdaulichen Energie (DE) von KIENZLE und ZEYNER (2010) kann nach Abzug der Energieverluste über Methan und der renalen Energieverluste, entsprechend der Regressionsgleichung aus der eigenen Studie, die Gleichung zur Berechnung der Umsetzbaren Energie (ME) angepasst werden (Rohnährstoff in g/kg TS):

DE (MJ/kg TS) =

$$-3,54 + 0,0209 \text{ Rohprotein} + 0,0420 \text{ Rohfett} + 0,0001 \text{ Rohfaser} + 0,0185 \text{ NfE}$$

ME (MJ/kg TS) =

$$-3,54 - \mathbf{0,325} + (0,0209 - \mathbf{0,0043}) \text{ Rohprotein} + 0,0420 \text{ Rohfett} \\ + (0,0001 - \mathbf{0,002}) \text{ Rohfaser} + 0,0185 \text{ NfE}$$

ME (MJ/kg TS) =

$$-3,865 + 0,0166 \text{ Rohprotein} + 0,0420 \text{ Rohfett} - 0,0019 \text{ Rohfaser} + 0,0185 \text{ NfE}$$

Mit der bisher verwendeten Gleichung zur Berechnung der ME (GfE 2014) und dem Abzug von pauschal 8 kJ/g Rohproteinaufnahme wurden insbesondere proteinreiche Futtermittel wie Soja oder Leinsamen hinsichtlich der renalen Energieverluste deutlich unterschätzt, was durch die Anpassung der Gleichung nun nicht mehr der Fall ist.

## 7. Zusammenfassung

In vorangegangenen Studien zeigte sich, dass die renalen Energieverluste beim Pferd im Vergleich mit anderen Säugetierspezies relativ hoch sind. Diese Verluste müssen zur Berechnung der Umsetzbaren Energie (ME) berücksichtigt werden.

In der vorliegenden Untersuchung sollten Daten zur renalen Energieausscheidung beim Pferd gesammelt werden. Ziel war es, eine für viele Futtermittel gültige Schätzgleichung für die renalen Energieverluste zu formulieren, sodass eine Anpassung des aktuellen GfE-Systems zur Ermittlung der ME-Gehalte von Futtermitteln möglich ist. Aktuell werden pauschal Energieverluste von 8 kJ pro g Rohproteinaufnahme für jedes Futtermittel abgezogen (GfE, 2014).

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse zur renalen Energie- und N-Ausscheidung bei den verschiedenen Rationen in verschiedenen Bezugssystemen.

**Tab. 4:** Renale Energie- und N-Ausscheidung bei den verschiedenen Rationen

Test-Futtermittel	Renale Energieausscheidung in kJ/kg KM <sup>0,75</sup>	Renale N-Ausscheidung in g/kg KM <sup>0,75</sup>	Renale Energieausscheidung in kJ/g TS-Aufnahme	Renale Energieausscheidung in kJ/g Rp-Aufnahme
Heu 1.Schnitt	36,4±11,9 <sup>ab</sup>	0,82±0,35 <sup>a</sup>	0,77±0,3 <sup>ab</sup>	9,2±2,9 <sup>a</sup>
Heu 2. Schnitt	46,7±4,4 <sup>ab</sup>	0,71±0,23 <sup>a</sup>	0,91±0,1 <sup>ab</sup>	6,7±0,7 <sup>ab</sup>
frisches Gras <sup>1</sup>	43,6±7,2 <sup>ab</sup>	0,68±0,09 <sup>a</sup>	0,85±0,2 <sup>ab</sup>	7,4±1,2 <sup>ab</sup>
Kräuter-Gras-Mix <sup>1</sup>	45,0±5,3 <sup>ab</sup>	0,58±0,05 <sup>a</sup>	0,63±0,2 <sup>ab</sup>	5,5±0,6 <sup>b</sup>
Kleegras <sup>1</sup>	49,2±6,2 <sup>a</sup>	0,67±0,07 <sup>a</sup>	0,93±0,2 <sup>a</sup>	7,2±0,9 <sup>ab</sup>
Rübenschnitzel <sup>1</sup>	31,2±5,3 <sup>b</sup>	0,52±0,12 <sup>a</sup>	0,77±0,2 <sup>ab</sup>	9,8±1,6 <sup>a</sup>
Reiskleie <sup>1</sup>	33,0±1,6 <sup>ab</sup>	0,53±0,05 <sup>a</sup>	0,80±0,2 <sup>ab</sup>	9,6±0,3 <sup>a</sup>
Stroh <sup>1</sup>	31,5±6,9 <sup>ab</sup>	0,33±0,07 <sup>a</sup>	0,57±0,2 <sup>b</sup>	9,6±2,0 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>vermischt mit Heu 1. Schnitt

*Mittelwerte in einer Spalte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind unterscheiden sich signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse, Holm-Sidak-Test,  $p < 0,05$ )*

Die renalen Energieverluste pro g TS-Aufnahme ( $y$ ; kJ/g TS) steigen linear mit dem Proteingehalt des Futtermittels in der TS ( $x$ ; g/kg TS):  $y = 0,325 + 0,0043x$  ( $r^2 = 0,81$ ;  $n = 38$ ;  $p < 0,001$ ). Dabei bildet der Regressionskoeffizient der Gleichung die renalen Energieverluste über Harnstoff und die weiteren N-haltigen Substanzen wie Allantoin und Kreatinin ab und stellt somit einen Faktor für den N-Stoffwechsel und damit einhergehend der Proteinaufnahme dar. Dagegen stellt das absolute Glied der Gleichung die Verluste über Produkte der Entgiftung von pflanzlichen Bestandteilen im Körper durch Hippursäure dar und damit einen Faktor für die durchschnittliche Aufnahme von Phenolsäuren.

Mittels dieses Ergebnisses ist es möglich, die bisher gültige Schätzgleichung zur Berechnung der Umsetzbaren Energie (GfE, 2014)

$$\text{ME (MJ/kg TS)} =$$

$$-3,54 + 0,0129 \text{ Rohprotein} + 0,0420 \text{ Rohfett} - 0,0019 \text{ Rohfaser} + 0,0185 \text{ NfE}$$

anzupassen, sodass sich nachfolgende Gleichung ergibt:

$$\text{ME (MJ/kg TS)} =$$

$$-3,865 + 0,0166 \text{ Rohprotein} + 0,0420 \text{ Rohfett} - 0,0019 \text{ Rohfaser} + 0,0185 \text{ NfE}$$

Auch von der im Tierversuch ermittelten oder mit anderen Gleichungen geschätzten Verdaulichen Energie kann der renale Energieverlust über die Regressionsgleichung  $y = 0,325 + 0,0043x$  ( $y$ : renale Energieverluste in kJ/g TS-Aufnahme;  $x$ : Rohproteingehalt in g/kg TS;) abgezogen werden.

## 8. Summary

Previous studies have shown that renal energy losses in horses are relatively high compared to other mammalian species. These losses must be taken into account when calculating the Metabolizable Energy (ME).

In the present study, data on renal energy excretion in horses should be collected. The aim was to formulate a predictive equation for renal energy losses that is valid for many feeds, so that an adaptation of the current GfE-system to determine the ME content of feeds is possible. Currently, a constant energy loss of 8 kJ per g of protein intake is deducted for each feed (GfE, 2014).

Table 5 shows the results for renal energy and N excretion in the different rations in different reference systems.

**Tab. 5:** Renal excretion of energy and N in the different rations

Test ingredient	Renal energy excretion in kJ/kg BW <sup>0.75</sup>	Renal N excretion in g/kg BW <sup>0.75</sup>	Renal energy excretion in kJ/g DM intake	Renal energy excretion in kJ/g CP intake
first cut hay	36.4±11.9 <sup>ab</sup>	0.82±0.35 <sup>a</sup>	0.77±0.3 <sup>ab</sup>	9.2±2.9 <sup>a</sup>
second cut hay	46.7±4.4 <sup>ab</sup>	0.71±0.23 <sup>a</sup>	0.91±0.1 <sup>ab</sup>	6.7±0.7 <sup>ab</sup>
fresh grass <sup>1</sup>	43.6±7.2 <sup>ab</sup>	0.68±0.09 <sup>a</sup>	0.85±0.2 <sup>ab</sup>	7.4±1.2 <sup>ab</sup>
herbs-grass-mix <sup>1</sup>	45.0±5,3 <sup>ab</sup>	0.58±0.05 <sup>a</sup>	0.63±0.2 <sup>ab</sup>	5.5±0.6 <sup>b</sup>
clover-grass-mix <sup>1</sup>	49.2±6.2 <sup>a</sup>	0.67±0.07 <sup>a</sup>	0.93±0.2 <sup>a</sup>	7.2±0.9 <sup>ab</sup>
sugar beet pulp <sup>1</sup>	31.2±5.3 <sup>b</sup>	0.52±0.12 <sup>a</sup>	0.77±0.2 <sup>ab</sup>	9.8±1.6 <sup>a</sup>
rice bran <sup>1</sup>	33.0±1.6 <sup>ab</sup>	0.53±0.05 <sup>a</sup>	0,80±0.2 <sup>ab</sup>	9.6±0.3 <sup>a</sup>
straw <sup>1</sup>	31.5±6.9 <sup>ab</sup>	0.33±0.07 <sup>a</sup>	0.57±0.2 <sup>b</sup>	9.6±2.0 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>mixed with first cut hay

*Means in the same column not sharing a superscript letter are significantly different (one-factor analysis of variance, Holm-Sidak-Test,  $p < 0.05$ ).*

The renal energy losses per g DM intake ( $y$ ; kJ/g DM) increase in a linear regression with the protein content of the feed in the DM ( $x$ ; g/kg DM):  $y = 0.325 + 0.0043x$  ( $r^2 = 0.81$ ;  $n = 38$ ;  $p < 0.001$ ). The regression coefficient of the equation shows the renal energy losses via urea and other N-containing substances such as allantoin and creatinine and thus represents a factor for the N metabolism and the associated protein intake. The intercept of the equation explains the losses via products of the detoxification of plant components in the body by hippuric acid and thus represents a factor for the average absorption of phenolic acids.

Using this result, it is possible to adapt the previously valid equation for calculating the Metabolizable Energy (GfE, 2014)

$$\text{ME (MJ/kg DM)} =$$

$$-3.54 + 0.0129 \text{ crude protein} + 0.0420 \text{ crude fat} - 0.0019 \text{ crude fibre} + 0.0185 \text{ Nfe}$$

so that the following equation results:

$$\text{ME (MJ/kg DM)} =$$

$$-3.865 + 0.0166 \text{ crude protein} + 0.0420 \text{ crude fat} - 0.0019 \text{ crude fibre} + 0.0185 \text{ Nfe}$$

With this regression equation  $y = 0.325 + 0.0043x$  ( $y$ : renal energy losses in kJ/g DM-intake;  $x$ : crude protein in g/kg DM), renal energy losses can also be subtracted from Digestible Energy determined by animal experiments or estimated with other equations.

## 9. Literaturverzeichnis

Berchtold, L., 2009: Untersuchungen zum Einfluss der Anionen-Kationen-Bilanz auf den Mineralstoff- und Säuren-Basen-Haushalt bei Ponys. Dissertation. Universität München.

Buchanan, C.J.; Fry, S.C.; Eastwood, M.A., 1996: The use of <sup>14</sup>C-labelled substrates to study plant cell wall breakdown in the gastrointestinal tract. *Proceedings of the Nutrition Society* 55, 927-936.

Burritt, E.A.; Bittner, A.S.; Street, J.C.; Anderson, M.J., 1984: Correlations of phenolic acids and xylose content of cell wall with in vitro dry matter digestibility of three maturing grasses. *Journal of Dairy Science* 67, 1209-1213.

Chesson, A.; Provan, G.J.; Russell, W.R.; Scobbie, L.; Richardson A.J.; Stewart, C., 1999: Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 373-378.

Cymbalu, N., 1990: Comparison of forage digestion by cattle and horses. *Canadian Journal of Animal Science* 70, 601-610.

Fahey, G.C. Jr., Jung, H.G., 1989: Phenolic compounds in forages and fibrous feedstuffs. In: Cheeke P.R. (ed.): *Toxicants of Plant Origin*. CRP Press, Florida, USA.

Fehrle, S., 1999: Untersuchungen zur Verdaulichkeit von Mischfutter beim Pferd in Abhängigkeit von der Raufutteraufnahme. Dissertation, Universität München.

Fingerling (1931 - 1939) zitiert von Fingerling 1953 (Fingerling, G., 1953: Der Erhaltungsbedarf der Pferde. In: *Untersuchungen über den Futterwert verschiedener Futtermittel*. Arbeiten aus dem Nachlass von O. Kellner und G. Fingerling. Festschrift anlässlich des 100jährigen Bestehens der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Leipzig-Möckern. Band I (Nehring, K.; Werner, A., eds.), pp. 327-334.), Franke 1954

(Franke, E.-R., 1954: Die Verdaulichkeit verschiedener Futtermittel beim Pferd. Versuchsergebnisse aus dem Nachlass von G. Fingerling. In: Untersuchungen über den Futterwert verschiedener Futtermittel. Arbeiten aus dem Nachlass von O. Kellner und G. Fingerling. Festschrift anlässlich des 100jährigen Bestehens der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Leipzig-Möckern. Band II (Nehring, K.; Werner, A., eds.), pp. 441-472.), Nehring and Franke 1956 (Nehring, K.; Franke, E.-R., 1956: Untersuchungen über den Stoff- und Energieumsatz und den Nährwert verschiedener Futtermittel beim Pferd. Versuchsergebnisse aus dem wissenschaftlichen Nachlass von G. Fingerling. In: Untersuchungen über den Futterwert verschiedener Futtermittel. Arbeiten aus dem Nachlass von O. Kellner und G. Fingerling. Festschrift anlässlich des 100jährigen Bestehens der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Leipzig-Möckern. Band III (Nehring, K., Hrsg.), 327-334.)

Foley, W.; Iason, G.R.; McArthur, C., 1999: Role of plant secondary metabolites in the nutritional ecology of mammalian herbivores: How far have we come in 25 years? Nutritional Ecology of Herbivores (Jung H. G.; Fahey G. C., eds.). Savoy, IL: American Society of Animal Science, 130-209.

Fontaine, J.; Bech-Andersen, S.; Butikofer, U.; de Froidmont-Görtz, I., 1998: Determination of tryptophan in feed by HPLC-development of an optimal hydrolysis and extraction procedure by the EU Commission DG XII in three international collaborative studies. *Agribiological Research* 51, 97-108.

GfE, Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 2014: Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden, Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere Nr. 11. DLG-Verlag, Frankfurt/Main, Deutschland.

Goren, G.; Fritz, J.; Dillitzer, N.; Hipp, B.; Kienzle, E., 2014: Fresh and preserved green fodder modify effects of urinary acidifiers on urine pH of horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98, 239–245.



Hackl, W.; Pieper, B.; Pieper, R.; Korn, U.; Zeyner, A., 2010: Effects of ensiling cereal grains (barley, wheat, triticale and rye) on total and pre-caecal digestibility of proximate nutrients and amino acids in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94, 729-735.

Hartley, R.D.; Jones, E.C.; Wood, T.M., 1976: Carbohydrates and carbohydrate esters of ferulic acid released from cell walls of *Lolium multiflorum* by treatment with cellulolytic enzymes. *Phytochemistry* 15, 305-307.

Hartley, R.D.; Morrison W.H., 1991: Monomeric and dimeric phenolic acids released from cell walls of grasses by sequential treatment with sodium hydroxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55, 365-375.

Hashimoto, M.; Funaba, M.; Ohshima, S.; Abe, M., 1995: Characteristic relation between dietary metabolizable energy content and digestible energy content in laboratory cats. *Experimental Animals* 44, 22-28.

Hipp, B.; Südekum K.-H.; Zeyner, A.; Goren, G.; Kienzle, E., 2017: Renal energy excretion of horses depends on renal hippuric acid and nitrogen excretion. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 102, e380–e386.

Hoffmann, L., 1972: Ableitungen von Energienormen im NEF-System. In: Hoffmann, L.; Schiemann, R.; Jentsch, W.: *Energetische Futterbewertung und Energienormen*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, Deutschland.

Hoffmann, L.; Klein, M., 1980: Die Abhängigkeit der Harnenergie vom Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt im Harn bei Rindern, Schafen, Schweinen und Ratten. *Archiv für Tierernährung* 30, 743-750.

Horn, F., 2015: *Biochemie des Menschen*. Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.

Iiyama, K.; Lam, T.B.T.; Stone B.A., 1990: Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* 29, 733-737.

Jeroch, H.; Flachowsky, G.; Weißbach, F., 1993: *Futtermittelkunde*. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, Deutschland.

Jung, H.G., 1989: Forage lignings and their effect on fiber digestibility. *Agronomy Journal* 81, 33-38.

Jung, H.G.; Casler, M.D., 1990: Lignin concentration and composition of divergent smooth bromegrass genotypes. *Crop Science* 30, 980-985.

Jung, H.G.; Deetz, D.A., 1993: Cell wall lignification and degradability. In: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility. International Symposium on Forage Cell Wall Structure and Digestibility* (Madison, Wisconsin, USA, 1991), 315-346.

Jung, H.G.; Fahey, G.C. Jr., 1983: Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: a review. *Journal of Animal Science* 57, 206-219.

Jung, H.G.; Fahey, G.C. Jr., Garst J. E., 1983a: Simple phenolic monomers of forages and effects of in vitro fermentation on cell wall phenolics. *Journal of Animal Science* 57, 1294-1305.

Jung, H.G.; Fahey G.C. Jr.; Merchen N.R., 1983b: Effects of ruminant digestion and metabolism on phenolic monomers and forages. *British Journal of Nutrition* 50, 637-651.

Jung, H.G.; Vogel, K.P., 1986: Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *Journal of Animal Science* 62, 1703-1712.

Kamphues, J.; Coenen, M.; Kienzle, E.; Wolf, P.; Eder, K.; Liesegang, A.; Zebeli, Q.; Männer, K.; Iben, C., Zentek, J., 2014: Supplemente zur Tierernährung für Studium und Praxis. M. & H. Schaper, Hannover, Deutschland.

Karlsson, C.P.; Lindberg J.E.; Rundgren M., 2000: Associative effects on total tract digestibility in horses fed different ratios of grass hay and whole oats. *Livestock Production Science* 65, 143-153.

Kienzle, E.; Berchtold, L.; Zeyner, A., 2009: Effects of hay versus concentrate on urinary energy excretion in horses. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 18, 118.

Kienzle, E.; Möllmann, F.; Nater, S.; Wanner, M.; Wichert, B., 2008: Mineral content of hay harvested in Bavarian and Swiss horse farms. Predictive value of cutting time, number of cut, botanical composition, origin and fertilization. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92, e712–e717.

Kienzle, E.; Zeyner, A., 2010: The development of a metabolizable energy system for horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94, e231–e240.

Kroon, P.A.; Faulds, C.B.; Ryden, P.; Robertson, J.A.; Williamson, G., 1997: Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 661-667.

Lindberg, J.E.; Karlsson, C.P., 2001: Effect of partial replacement of oats with sugar beet pulp and maize oil on nutrient utilization in horses. *Equine Veterinary Journal* 33, 585-590.

Lindemann, G., 1982: Untersuchungen über den Einfluss von Lactose- und Stärkezulagen auf die Verdaulichkeit von NH<sub>3</sub>-aufgeschlossenem Stroh beim Pferd. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L., 2004: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727-747.

Meyer, H.; Coenen, M., 2014: *Pferdefütterung*. Enke Verlag, Stuttgart, Germany.

Moore-Colyer, M.; Longland, A., 2000: Intakes and in vivo apparent digestibilities of four types of conserved grass forage by ponies. *Animal Science* 71, 527-534.

Moore-Colyer, M.; Longland, A., 2001: The effect of plain sugar beet pulp on the in vitro gas production and in vivo apparent digestibility of hay when offered to ponies. *Proceedings of the 17th Symposium of Equine Nutrition and Physiology Society*, 145-147.

National Research Council NRC, 2006: *Nutrient Requirements of Dogs and Cats*. National Academy Press, Washington, DC.

Nehring, K., 1972: *Lehrbuch der Tierernährung und Futtermittelkunde*. 9. überarb. Auflage. Neumann Verlag, Radebeul, Deutschland.

Oestmann, A.; Südekum, K.-H.; Voigt, K.; Stangassinger, M., 1995: Zur Rolle von Lignin und phenolischen Monomeren in Futtermitteln für Wiederkäuer, I. Vorkommen, Funktionen und Nachweisverfahren. *Übersichten zur Tierernährung* 23, 105-131.

Ordakowski-Burk, A.; Quinn, R.; Shellem, T.; Vough, L., 2006: Voluntary intake and digestibility of reed canarygrass and timothy hay fed to horses. *Journal of Animal Science* 84, 3104-3109.

Paech, K., 1950: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. In: Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, erster Band, zweiter Teil. Springer Verlag, Berlin und Heidelberg, Deutschland.

Pagan, J.D.; Hintz, H.F., 1986: Equine energetics. I. Relationship between body weight and energy requirements in horses. *Journal of Animal Science* 63, 815–821.

Peiretti, P.G.; Meineri, G.; Miraglia, N.; Mucciarelli, M.; Bergero, D., 2006: Intake and apparent digestibility of hay or hay plus concentrate diets determined in horses by the total collection of feces and n-alkanes as internal markers. *Livestock Science* 100, 189-194.

Ragnarsson, S., 2009: Digestibility and metabolism in Icelandic horses fed forage-only diets. Doctoral thesis No. 2009/92, University of Uppsala, Sweden.

Schiele, K., 2008: Einfluss reduzierter Futterzuteilung zweier verschiedener Heuqualitäten auf Passagedauer und Verdaulichkeit bei Ponys. Dissertation, Universität München.

Schiemann, R.; Jentsch, W.; Wittenburg, H., 1971: Zur Abhängigkeit der Verdaulichkeit der Energie und der Nährstoffe von der Höhe der Futteraufnahme und der Rationszusammensetzung bei Milchkühen. *Archiv für Tierernährung* 21:3, 223-240.

Schiemann, R.; Nehring, K.; Hoffmann, L.; Jentsch, W.; Chudy, A., 1972: Das DDR-Futterbewertungssystem. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin, Deutschland.

Schmidt, M., 1980: Untersuchungen über die Verträglichkeit und Verdaulichkeit eines pelletierten Mischfutters für Pferde in Kombination mit Heu und NH<sub>3</sub>-aufgeschlossenem Stroh. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Stryer, L.; Gatto, G.J.; Tymoczko J.L.; Berg, J.M., 2017: Stryer Biochemie. 8. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland.

Stürmer, K., 2005: Untersuchungen zum Einfluss der Fütterung auf den Säure-Basen-Haushalt bei Ponys. Dissertation, Universität München.

Titgemeyer, E.C.; Bourquin L.D.; Fahey, G.C. Jr., 1992: Disappearance of cell wall monomeric components from fractions chemically isolated from alfalfa leaves and stems following in-situ ruminal digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58, 451-463.

VDLUFA, 2012. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Band III. Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Germany.

VDLUFA, 2012. 2016: Methode 4.13.1, Bestimmung des Neutral-Detergenzien-löslichen Rohproteins (NDLXP). Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Bd. III. Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Germany.

Vermorel, M.; Martin-Rosset, W.; Vernet J., 1997a: Energy utilization of twelve forages or mixed diets for maintenance by sport horses. *Livestock Production Science* 47, 157-167.

Vermorel, M.; Vernet, J.; Martin-Rosset, W., 1997b: Digestive and energy utilisation of two diets by ponies and horses. *Livestock Production Science* 51, 13-19.

von Engelhardt, W., 2015: Physiologie der Haussäugetiere. 5. überarb. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland.

Wald, C., 2003: Gewürze & Co. - eine Übersicht. Lohmann Information 3, 1–5

Watzl, B.; Rechkemmer, G., 2001: Phenolsäuren - Basiswissen aktualisiert. Ernährungs-Umschau 48, 413-416.

Wolffram, S.; Weber, T.; Grenacher, B.; Scharrer, E., 1995: A Na(+)-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. The Journal of Nutrition 125, 1300-1308.

Zeyner, A.; Kienzle, E., 2002: A method to estimate digestible energy in horse feed. The Journal of Nutrition 132, 1171S–1773S.

Zhao, Z.; Egashira, Y.; Sanada, H., 2005: Phenolic antioxidants richly contained in corn bran are slightly bioavailable in rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 5030-5035.





## **10. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Ellen Kienzle für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung bei der Vollendung dieser Arbeit bedanken. Ohne ihren Rat und ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Allen Tierpflegern am Oberwiesenfeld danke ich für die Hilfsbereitschaft, ganz besonders aber Gabi Reder. Herzlichen Dank für die Unterstützung bei der Versorgung und Verpflegung der Ponys, die Hilfe bei der Vorbereitung der Proben für die Analytik und vielem weiteren mehr.

Ich bedanke mich zudem bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik in Oberschleißheim, die mir bei kleineren oder größeren Problemen mit Rat und Tat zu Seite standen. Ein ganz besonderer Dank geht hierbei an das Laborteam, insbesondere Christian Overdiek, für die Analytik meiner zahlreichen Proben.

Bei Dr. Natalie Dillitzer möchte ich mich für die flexible Arbeitszeit während meiner Versuche bedanken und das große Verständnis und die Unterstützung zu jeder Zeit dieser Arbeit. Meiner lieben Kollegin Dr. Melanie Thes danke ich, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und manchmal mit neuen Denkanstößen die Knoten in meinem Kopf lösen konnte.

Für das Lesen der Arbeit und die Korrektur bedanke ich mich herzlich bei Tanja Sauerer-Nusko.

Außerdem möchte ich meinen Eltern Josef und Marion dafür danken, dass sie mir dieses Studium und die Doktorarbeit ermöglicht haben.

Zuletzt bedanke ich mich von Herzen bei Dominik Englert und meinen Freunden, welche mich jederzeit sowohl physisch als auch psychisch unterstützt haben.