

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

**Einfluss des Bedampfens von Heu auf die geschätzte
praecaecale Verdaulichkeit von Protein und
Aminosäuren für Pferde**

Caroline Pisch
von der Insel Rügen

München 2023

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Angefertigt am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Naturwissenschaftliche Fakultät III

Mentorin: Univ.-Prof. Dr. Annette Zeyner

**Gedruckt mit 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: Univ.-Prof. Dr. Angelika Schoster

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

Meiner lieben Oma.

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- Pisch et al. (2022): Effect of hay steaming on the estimated precaecal digestibility of crude protein and selected amino acids in horses. Vortrag auf dem 26. Kongress der ESVCN, Basel, Schweiz.
- Pisch et al. (2022): Effect of hay steaming on the estimated precaecal digestibility of crude protein and selected amino acids in horses. Vortrag auf der 76. Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE), Göttingen, Deutschland.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	X
TABELLENVERZEICHNIS	XI
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Speicherproteine in Pflanzen	3
2. Analytische Methoden zur Proteinbestimmung	4
2.1. Weender Futtermittelanalyse	4
2.2. Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS)	5
2.3. Die praecaecale Proteinverdaulichkeit beim Pferd	6
3. Maillard – Reaktionsprodukte	9
3.1. Entstehung und Definition	9
3.2. Maillard-Reaktionsprodukte im bedampften Heu	10
3.3. Bioverfügbarkeit von MRP	11
4. Equines Asthma und bedampftes Heu.....	12
III. PUBLIKATION.....	13
Abstract	15
1. Introduction	16
2. Materials and Methods	17
2.1. Study design	17
2.2. Sensory analyses.....	18
2.3. Analytical Methods and Calculations.....	18
2.4. Statistical Analysis	20
3. Results	21
3.1. Sensory Analyses	21
3.2. Proximate Nutrients.....	21
3.3. Maillard Reaction Products	22

3.4.	Macro and Trace Elements	23
4.	Discussion	23
5.	Conclusion	26
6.	References.....	27
IV.	DISKUSSION.....	50
V.	ZUSAMMENFASSUNG	60
VI.	SUMMARY	62
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	64
VIII.	DANKSAGUNG.....	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	<i>Amino acid</i>
ADFom	<i>Aschefreie Säure-Detergenzien-Faser (Acid Detergent Fibre</i>
ADL	<i>Säure-Detergenzien-Lignin (Acid Detergent Lignin)</i>
aNDFom	<i>Aschfreie Neutral-Detergenzien-Faser (Neutral Detergent Fibre</i>
AP	<i>Amadori-Produkt</i>
Arg	<i>Arginin</i>
AS	<i>Aminosäure</i>
CA	<i>Crude ash</i>
CF	<i>Crude fibre</i>
CL	<i>Crude fat</i>
CML	<i>Carboxymethyllysine</i>
CNCPS	<i>Cornell Net Carbohydrate and Protein System</i>
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
CP	<i>Crude protein</i>
Cys	<i>Cystine</i>
DM	<i>Dry matter</i>
EA	<i>Equine Asthma</i>
EAS	<i>essentielle Aminosäure</i>
GfE	<i>Gesellschaft für Ernährungsphysiologie</i>
HCl	<i>Salzsäure (Hydrochloric acid)</i>
HMF	<i>Hydroxymethylfurfural</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IAD	<i>Inflammatory airway disease</i>
kWh	<i>kilowatt hour</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LSM	<i>Least square means</i>
Lys	<i>Lysine</i>
ME	<i>Metabolische Energie (Metabolisable Energy)</i>
Met	<i>Methionine</i>
MR	<i>Maillard-Reaktion</i>
MRP	<i>Maillard-Reaktionsprodukte</i>

N	<i>Stickstoff</i>
NDICP	<i>Neutral detergent insoluble crude protein</i>
NDIXP	<i>Neutral-Detergenzien-unlösliches Rohprotein</i>
NDSCP	<i>Neutral detergent soluble crude protein</i>
NDSXP	<i>Neutral-Detergenzien-lösliches Rohprotein</i>
NPN	<i>Nicht-Protein-Stickstoff</i>
pcd	<i>Precaecal digestible</i>
pcD	<i>Precaecal digestibility</i>
pcv	<i>Praecaecal verdaulich</i>
pcV	<i>Praecaecale Verdaulichkeit</i>
pcvAS	<i>Praecaecal verdauliche Aminosäure</i>
pcvXP	<i>Praecaecal verdauliches Rohprotein</i>
piCP	<i>Pepsin insoluble crude protein</i>
PS	<i>Protein solubility</i>
R ²	<i>Bestimmtheitsmaß</i>
RAO	<i>Recurrent airway obstruction</i>
Thr	<i>Threonin</i>
TM	<i>Trockenmasse</i>
Trp	<i>Tryptophan</i>
VDLUFA	<i>Verband Deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten</i>
WLK	<i>Wasserlösliche Kohlenhydrate</i>
WSC	<i>Water-soluble carbohydrates</i>
XP	<i>Rohprotein</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Lineare Abhängigkeit des Gehaltes an NDIXP von der Summe der MRP Furosin und CML im bedampften Heu	53
Abbildung 2. Lineare Abhängigkeit des Gehaltes an Lysin von dem MRP Furosin im bedampften Heu.....	54
Abbildung 3. Lineare Abhängigkeit des Gehaltes an Arginin und dem unlöslichen Teil des Proteins NDIXP im bedampften Heu	55
Abbildung 4. Pepsin-unlösliches Rohprotein (puXP) in % des XP je Heucharge	58
Abbildung 5. Lineare Abhängigkeit des Gehaltes von puXP [% des XP] an NDIXP	59

Abbildungen in der Publikation:

Figure 1. Rise of temperature inside the tested hay nets during steaming in a Haygain One. Specifications are given in the text.....	40
Figure 2. Contents of crude protein (CP), neutral detergent insoluble CP (NDICP) and precaecal digestible CP (pcdCP) in native (green bars) and steamed hay (orange bars); *with $p < 0.05$ significant differences of means. .	41
Figure 3. Contents of selected essential amino acids (EAA) and precaecal digestible EAA (pcdEAA) in native (green bars) and steamed hay (orange bars); *with $p < 0.05$ significant differences of means; Lys = lysine, SAA = sulfuric amino acids (i.e., methionine + cysteine), Thr = threonine.....	42
Figure 4. Maillard reaction products in native and steamed hay	43
Figure 5. Linear relationship between protein solubility [% CP] and furosine [mg/100 g DM] in native and steamed hay.....	44
Figure 6. Linear relationship between protein solubility [% CP] and CML [mg/100g DM] in native and steamed hay; CML = carboxymethyllysine. Fehler! Textmarke nicht definiert.	

Figure S 1. Lysine [g/kg DM] compared to furosine [mg/100g DM]	46
Figure S 2. pcdLys [g/kg DM] compared to furosine [mg/100g DM]	47
Figure S 3. pcD of CP in [% CP] compared to furosine [mg/100g DM]	48
Figure S 4. pcD of CP in [% CP] compared to piCP in [% CP].....	49

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Empfehlungen zur Versorgung von Pferden unter Erhaltungsbedingungen mit praecaecal verdaulichem Rohprotein und ausgewählten praecaecal verdaulichen, essentiellen Aminosäuren (GfE 2014) und dafür erforderliche Heumenge	56
---	----

Tabellen in der Publikation:

Table 1. Results for sensory analysis of each hay sample according to Kamphues et al. [1].	34
---	----

Table 2. Least square means and standard error (SE) of analysed nutrients, including calculated contents of pcdCP, pcdD of CP, pcdEAA and metabolisable energy depending on the treatment (native or steamed)	35
--	----

Table 3. Least square means and standard error (SE) of the analysed contents of essential and non-essential amino acids (AA) in meadow hay depending on treatment (native or steamed).	37
---	----

Table S 1. Evaluation of the hygienic status of hay by sensory analysis in accordance with Kamphues et al. [1].	38
--	----

Table S 2. Evaluation of forage value and hygienic status according to Kamphues et al. [1].	39
--	----

Table S 3. Linear regression for individual batch of hay.	39
---	----

I. EINLEITUNG

Aminosäuren als Grundbausteine allen Lebens spielen eine zentrale Rolle in der Versorgung von Menschen und Tieren. Sie sind an allen lebenswichtigen Funktionen beteiligt und zumindest essentielle Aminosäuren müssen über die Nahrung aufgenommen werden. Aminosäuren (AS) werden in Form von Reserveproteinen in Pflanzen gespeichert und nehmen einen weltweiten Stellenwert für die Ernährung ein. Sie dienen der Ernährung der Weltbevölkerung, dies geschieht einerseits auf direktem Weg und andererseits durch die Verfütterung an Tiere. Auch Pferde benötigen essentielle AS (EAS), welche Sie durch körpereigene Enzyme im Dünndarm freisetzen und absorbieren (Schubert, 1997). Die Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2014) etablierte ein neues Proteinbewertungssystem für Pferde. In diesem wird der Begriff des „praecaecal verdaulichen“ Rohproteins (pcvXP) für Deutschland eingeführt (GfE, 2014). Das Schätzsystem basiert auf Literaturdaten zur praecaecalen Verdaulichkeit (pcV) von Futtermitteln für Pferde und wurde auf Grundlage des Cornell-Bewertungssystems zur Proteinfractionierung von Futtermitteln für Wiederkäuer entwickelt (Fox et al., 1992; Russell et al., 1992; Sniffen et al., 1992; O'Connor et al., 1993; Licitra et al., 1996). Das Rohprotein (XP) wird einerseits in einen löslichen Anteil, welcher vom Pferd potentiell praecaecal verdaut und als AS absorbiert werden kann, und andererseits in einen unlöslichen, weitgehend unverdaulichen Anteil gegliedert. Der unlösliche Teil kann im Dünndarm des Pferdes nicht durch körpereigene Enzyme verdaut, aber vermutlich im Dickdarm von den Mikroben umgesetzt werden. Daraufhin wird der lösliche Teil des Proteins für Ableitungen zur pcV genutzt und erstmals auch auf „praecaecal verdauliche“ AS (pcvAS) übertragen. Eine quantitativ, relevante postileale Aminosäureabsorption schließt die GfE (2014) u.a. auf der Grundlage nachfolgend, zusammengefasster Literatur nahezu aus. Da viele Faktoren, wie z.B. die thermische Behandlung von Futtermitteln, die pcV vom XP beeinflussen können, war es das Ziel dieser Arbeit den Einfluss der Bedampfung von Heu auf die pcV von XP und AS zu untersuchen.

Die Bedampfung von Heu spielt eine zentrale Rolle bei der Hygienisierung von Grobfutter für atemwegserkrankte Pferde. Um das Grobfutter von lebensfähigen Mikroorganismen oder inhalierbarem Staub zu befreien, wurde die Methode der Heubedampfung eingeführt. Zahlreiche Studien belegten bereits eine Reduktion dieser anhaftenden Mikroorganismen von bis zu 99% nach der Bedampfung von Heu (Moore-Colyer et al., 2014, 2016; Glatter et al., 2021). In Bezug auf den XP-Gehalt wurde in diesen Studien festgestellt, dass dieser durch die Behandlung weitgehend unbeeinflusst bleibt (Moore-Colyer et al., 2014, 2016). Eine Unterteilung in lösliches bzw. unlösliches Protein erfolgte jedoch nicht. Glatter et al. (2021) stellte in einer Pilotstudie an nur einer Heuprobe fest, dass Bedampfen mit einer Abnahme der pcV des XP verbunden war.

Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen war daher, ob dieser gemessene, die pcV von XP und AS reduzierende Effekt des Bedampfens von Heu systematisch auftritt und die Hitzewirkung anhand einer korrespondierenden Formierung von Maillard-Reaktions-Produkten (MRP) nachweisbar ist. Die Hypothese war, dass Bedampfen von Heu zu einer Reduktion der pcV von XP und AS führt und sich somit der Gehalt an deren praecaecal verdaulichem Anteil im Futter reduziert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Speicherproteine in Pflanzen

Pflanzenzellen besitzen im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen eine Zellwand, die Stabilität und vor allem Schutz vor äußeren Reizen bzw. Infektionen bietet. Die Zellwände bestehen zu etwa 90% aus Kohlenhydraten und 10 % aus Proteinen. Dabei bilden die Gerüstkohlenhydrate Zellulose, Hemizellulose und Pektin die Grundlage. Pflanzen, wie beispielsweise die Gräser, welche die Nahrungsgrundlage der Equiden darstellen, bilden eine Primärzellwand aus die zu ca. 20 bis 30 % aus Zellulose, 25 % Hemizellulose, 30 % Pektin und 5 bis 10 % Glykoproteinen besteht. D-Glukosemoleküle bilden die Grundlage der Zellulose mit Kettenlängen von 2.000 bis 25.000 Glukoseresten. Diese lagern sich zu Mikrofibrillen zusammen mit hoher Reißfestigkeit und Stabilität. Pferde sind in der Lage mit Hilfe von im Dickdarm endemischen Mikroorganismen die Zellulose in Anwesenheit von Zellulase und anderen gerüstkohlenhydratspaltenden Enzymen hydrolytisch zu spalten. Pektine besitzen freie Carboxygruppen an welche sich Ca^{2+} und Mg^{2+} - Ionen anlagern und so stabile Pektinstränge bilden (Heldt & Piechulla, 2015). Zusammen formen die Hemizellulose, Pektin und die Glykoproteine die Matrix für die Mikrofibrillen der Zellulose. Im nächsten Schritt bildet die Pflanze eine Sekundärwand überwiegend aus Zellulose. Wird in diese Schicht Lignin eingelagert, führt dies zu einer „Verholzung“ der Zelle, welche im weiteren Verlauf und abhängig vom Lignifizierungsgrades lediglich eine Stützfunktion einnimmt (Vanholme et al., 2010). Außerdem besteht die Pflanzenzelle zu ca. 80 % aus einer Vakuole welche nicht nur der Aufrechterhaltung des Zellurgors dient. Die Vakuole besitzt vielfältige Aufgaben die von der Speicherung von Proteinen, Nitrat, Phosphat bis hin zur Einlagerung von Fremdstoffen bzw. als Verdauungsorganelle dient (Jolliffe et al., 2005). Doch die bei der Nitratassimilation gebildeten AS, welche u.a. für die Keimung benötigt werden, können in speziellen Speicherproteinen in einem Proteinkörper gelagert werden (Vitale & Hinz, 2005). Bereits 1924 fraktionierte Osborne die Pflanzenproteine nach ihren Löslichkeitseigenschaften in Albumine (wasserlöslich), Globuline (löslich in

verdünnter Salzlösung), Gluteline (löslich in verdünnten Alkali- und Säurelösungen) und Prolamine (löslich in wässrigem Ethanol) (Shewry & Casey, 1999). In Hülsenfrüchten ist das Hauptspeicherprotein das Legumin, welches zu den Globulinen gehört (Sharif et al., 2018). In den Gräsern sind es u.a. die Prolamine (Shewry & Casey, 1999). Abhängig von äußeren Umweltbedingungen und dem Vegetationsstadium bzw. des infrage kommenden Proteins kann auch das Aminosäurenmuster der Pflanze unterschiedlich sein. Proteinstrukturen können in unterschiedlichem Ausmaß von endogenen bzw. mikrobiellen Enzymen zu niedermolekularen Verbindungen oder Aminosäuren abgebaut werden (van Soest & Mason, 1991; Sniffen et al., 1992). Wobei das Ausmaß des Abbaus von verschiedenen Faktoren, wie der Lokalisation innerhalb pflanzlicher Strukturen (Zellwand vs. Zellinneres), dem Lignifizierungsgrad der Zellwand (Inkrustierung), dem Protein per se sowie dem Grad einer evtl. Hitzeschädigung abhängt.

2. Analytische Methoden zur Proteinbestimmung

2.1. Weender Futtermittelanalyse

Die quantitative Bestimmung von Reinprotein ist aufwändig. Für den Zweck der Proteinbewertung von Futtermitteln schien daher zunächst die Bestimmung von Stickstoff und daraus die Berechnung bzw. Schätzung des Rohproteingehaltes nach dem Weender Analyseverfahren ausreichend. Die bereits 1860 von Henneberg und Stohmann etablierte Weender Analyse findet noch heute Anwendung in der Futtermittelanalytik und wird methodisch vom Verband Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA, 2012) gepflegt. Zur Analytik zählt unter anderem die Bestimmung des Rohproteins (XP). Dies umfasst die gesamten stickstoffhaltigen Substanzen, welche aus Reinprotein und Nicht-Protein-Stickstoff (NPN) -Verbindungen bestehen. Zu letzteren zählen beispielsweise freie Aminosäuren, Amine, Alkaloide oder Ammoniak, z.B. aus Silagen (Schmidt - Wetterau, 1972). Bei der Rohproteinbestimmung im Rahmen der Weender Analyse wird im Mittel ein N-Gehalt von 16 % im Protein unterstellt, und dies auf XP übertragen. Um den XP-Gehalt zu

berechnen, muss der analytisch ermittelte N-Gehalt daher mit dem Faktor 6,25 multipliziert werden. Der Gehalt an XP charakterisiert rein quantitativ den Gehalt an N-haltigen Substanzen, trifft jedoch keine Aussage über deren Löslichkeit, welche jedoch zur Schätzung von Verdaulichkeit bzw. Fermentierbarkeit genutzt werden könnte. So wird für Pferde die Löslichkeit zur Schätzung der pcV von Proteinen und AS aus dem Futter genutzt (GfE 2014; Zeyner et al., 2015). Als Basis für die Fraktionierung von XP nach der Löslichkeit diente das für Wiederkäuer entwickelte Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS).

2.2. Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS)

Um das Fütterungsmanagement von Nutztieren zu verbessern wurde bereits 1992 und 1993 das Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) in einer Reihe von vier Artikeln veröffentlicht (Fox et al., 1992; Russell et al., 1992; Sniffen et al., 1992; O'Connor et al., 1993). Das Hauptziel des CNCPS bestand darin, ein Instrument für die Formulierung von Rationen für Rinder zu schaffen (Russell et al., 1992; Fox et al., 2004). Um diese Ziele zu erreichen, wurde das System stetig weiterentwickelt, indem neue Forschungsdaten und Beschreibungen der Pansenfunktion und des Pansenstoffwechsels in mathematische Gleichungen und quantitative Darstellungen eingearbeitet wurden (Lanzas et al., 2007). Infolgedessen werden in den letzten Jahren immer wieder aktualisierte Versionen veröffentlicht (Fox et al., 2004; Tylutki et al., 2008; Van Amburgh et al., 2013, 2015). Wie bei der Weender Futtermittelanalytik bereits beschrieben lässt sich durch die XP-Analyse allein der lösliche und damit besser fermentierbare Anteil des Proteins nicht bestimmen. Das CNCPS-System fraktioniert das Protein hinsichtlich seiner Löslichkeit als Schätzgröße für die ruminale Abbaubarkeit zunächst in die Fraktionen A, B1, B2, B3 und C (Sniffen et al., 1992; Licitra et al., 1996). Die Summe der Fraktionen A und B1 bezeichnet man beim Wiederkäuer auch als „lösliches Protein“, welches potentiell vollständig im Pansen abgebaut werden kann. Fraktion A enthält NPN-Verbindungen, welche durch Pansenbakterien rasch zu Ammoniak fermentiert werden. B1 wird, wie die Fraktionen B2 bis C auch als „echtes Protein“ beschrieben. Beide Fraktionen sind in Phosphat-Borat-Puffer

löslich, wobei B1 als Trichloressigsäure fällbares „echtes Protein“ bestimmt wird. Nicht im Phosphat-Borat-Puffer löslich aber in neutraler Detergenzien-Lösung ist die Fraktion B2. Es hat eine mittlere Abbaurate und wird nicht zwangsläufig vollständig im Pansen abgebaut. Die Fraktion B3 liegt als zellwandgebundener N vor und wird entsprechend nur sehr langsam bis gar nicht im Pansen fermentiert (Sniffen et al., 1992). Fraktion B3 ist unlöslich in neutraler Detergenzien-Lösung, aber löslich in saurer Detergenzien-Lösung. Die Fraktion C wiederum ist unlöslich in saurer Detergenzien-Lösung und kann durch die Pansenbakterien nicht abgebaut werden. Somit werden postruminal aus dieser Fraktion keine Aminosäuren bereitgestellt (Krishnamoorthy et al. 1982, 1983).

2.3. Die praecaecale Proteinverdaulichkeit beim Pferd

Das aktuelle Bestreben bei landwirtschaftlichen Nutztieren ist, den Gehalt an dünnarmverdaulichem Rohprotein und wichtigen dünnarmverdaulichen essentiellen Aminosäuren als Basis für die Proteinbewertung von Futtermitteln zu nutzen. Tierartspezifisch liegt dazu ein unterschiedlicher Erkenntnisgewinn vor. Da beim Wiederkäuer das Vormagensystem dem restlichen Darm vorgelagert ist, stellt dies einen erheblichen Unterschied zum Pferd dar. Frühere Forschungsarbeiten weisen darauf hin, dass der Dickdarm des Pferdes scheinbar nicht in der Lage ist, Aminosäuren in einer für die Futterbewertung relevanten Größenordnung zu absorbieren. Die Gesellschaft für Ernährungsphysiologie hat diesem Ansatz folgend 2014 ein neues Proteinbewertungssystem und Versorgungsempfehlungen für Pferde veröffentlicht. Dieses basiert auf einer Anwendung der Proteinlöslichkeit auf Experimente zur pcV von XP an Pferden aus dem Schrifttum (Auswertung siehe Zeyner et al., 2015) mit Etablierung von „praecaecal verdaulichem“ (pcv) XP und pcvAS als Kenngrößen der Proteinbewertung für Equiden in Deutschland (GfE, 2014; Zeyner et al., 2015). Aufgrund der geringen Anzahl experimentell bestimmter Daten zur pcV von XP oder gar AS wurde zur Ableitung dieser partiellen Verdaulichkeit auf die Proteinfractionierung auf der Grundlage des CNCPS-Systems bzw. nach Licitra et al. (1996) zurückgegriffen, und das XP in einen löslichen und einen unlöslichen Teil

fraktioniert. Abweichend vom Wiederkäuer wird beim Pferd die Summe die Fraktionen B3 und C als unlösliches Protein angenommen, A, B1 und B2 gelten als potentiell, wenn auch nicht immer vollständig, bis zum Ende des Dünndarmes verdaulich. Für diese Fraktionierung wurde vom VDLUFA eine eigenständige Analysemethode etabliert, bzw. weitgehend dem CNCPS entlehnt, wodurch eine Fraktionierung in Neutral-Detergenzien-unlösliches Rohprotein (NDIXP) und Neutral-Detergenzien-lösliches Rohprotein (NDSXP) möglich ist (VDLUFA, 2016).

Die Fraktionen B3 und C sind zellwandgebunden und potentiell unlöslich bzw. nicht praecaecal verdaulich und werden dem NDIXP zugerechnet. Sie schließen vermutlich veränderte Proteine, wie die Produkte der Maillard Reaktion, oder „lignin-assoziierte“ Bestandteile mit ein. Das lösliche Protein für Pferde besteht aus den Fraktionen A, B1 und B2 des CNCPS-Systems (hier: NDSXP), und ist potentiell praecaecal verdaulich, d.h. es kann entsprechend durch körpereigene Enzyme aufgeschlossen werden. Es umfasst überwiegend die als Reserveproteine bezeichneten Speicherproteine der Pflanzenzelle. Im VDLUFA-Verfahren wird aus analytischer Sicht NDIXP bestimmt, jedoch basierend auf der hinterlegten Gleichung wird gleich NDSXP ausgewiesen. Zwischen XP und den Subfraktionen besteht daher die in Gleichung 2.1 angegebene stochastische Beziehung der gravimetrisch abgebildeten Variablen.

Gleichung 2.1 – alle Angaben in [g/kg TM]

$$\text{NDSXP} = \text{XP} - \text{NDIXP}$$

Die regressive Literaturauswertung von Zeyner et al. (2015) legt eine etwa 90 %-ige Absorbierbarkeit von NDSXP nahe, weshalb der Gehalt an pcvXP wie in Gleichung 2.2. angegeben berechnet werden kann.

Gleichung 2.2 – alle Angaben in [g/kg TM]

$$\text{pcvXP} = 0,9 \times \text{NDLXP}$$

Dabei resultiert der Faktor 0,9 aus der Regressionsanalyse der ausgewerteten Verdaulichkeitsuntersuchungen (Reitnour et al., 1969; Hintz et al., 1971; Haley et al. 1979; Klendshoj et al. 1979; Krull, 1984; Gibbs et al., 1988, 1996). Zeyner et al. (2015) zeigte eine positive Korrelation zwischen der Lebendmasse (LM) -bezogenen Aufnahme an NDIXP und der

aus der Literatur entnommenen Aufnahme an pcvXP ($r = 0,899$, $p < 0,001$). Entsprechend zeigte auch die Aufnahme an NDSXP eine positive Korrelation zur Aufnahme an pcvXP ($r = 0,895$; $p < 0,001$). Aus dem Anstieg der letztgenannten linearen Regression konnte nun auf eine scheinbare praecaecale Verdaulichkeit des XP von 90 % geschlossen werden (Zeyner et al., 2015).

In diesbezüglichen Studien waren die AS-Profile in der löslichen und unlöslichen XP-Fraktion bzw. im gesamten XP von ausgewählten Grobfuttermitteln, Konzentraten und Mischfuttermitteln ausreichend ähnlich um zum Zweck der Proteinbewertung eine Übertragung des AS-Musters vom XP auf das NDSXP (ASNDSXP) zu rechtfertigen (Rebolé et al., 2001; Tedeschi et al., 2001). Daher wurde in der GfE Broschüre (2014) und in der Arbeit von Zeyner et al. (2015) den Proteinfractionen NDIXP und NDSXP ein für die Zwecke der Proteinbewertung hinreichend ähnliches AS-Muster unterstellt, woraus sich folgende Gleichung ergibt:

Gleichung 2.3 – alle Angaben in [g/kg TM]

$$\text{pcv AS} = 0,9 \times \text{ASNDSXP}$$

Auf der Seite der Futterbewertung kann der Gehalt an allen proteinogenen pcvXP abgeleitet werden, auf der Bedarfsseite beschränken sich die Empfehlungen der GfE (2014) der Datenverfügbarkeit geschuldet auf pcv Lysin (Lys), pcv Threonin (Thr) und als Summe der schwefelhaltigen AS pcv Methionin (Met) und Cystin (Cys). Bei freien AS geht die GfE (2014) davon aus, dass diese zu 100 % praecaecal absorbiert werden. Anstelle des Faktors 0,9 könnte hier in der oben genannten Gleichung Faktor 1 eingesetzt werden, was allerdings wenig praktikabel ist. Ammoniak kommt allenfalls in Silagen in nennenswerten Mengen vor, welche jedoch in Deutschland kaum an Pferde verfüttert werden. Die hierzulande typischen, TM-reichen Heulagen weisen Gehalte an Ammoniak-N von maximal 4 % auf (Zeyner et al. 2020), was im Rahmen der Proteinbewertung vernachlässigt werden kann.

3. Maillard – Reaktionsprodukte

3.1. Entstehung und Definition

Bereits 1912 beschrieb Louis-Camille Maillard die Reaktion von reduzierenden Kohlenhydraten mit Aminoverbindungen in thermisch verarbeiteten Lebensmitteln (Hellwig & Henle, 2014). Seitdem gibt es auch in der Futtermittelindustrie zahlreiche Untersuchungen zu der Entstehung von Maillard-Reaktions-Produkten (MRP). Van Soest (1991) bezeichnete die Maillard Verbindung als „Lignin-like“ und somit als potentiell unverdaulich. Generell handelt es sich um eine „nicht-enzymatisch“ bedingte chemische Reaktion von einem reduzierenden Zucker mit einer Aminokomponente. Die Maillard-Reaktion (MR) kann innerhalb eines Organismus stattfinden und wird dann auch als „Glykierung“ bezeichnet (Hellwig & Henle, 2014). In der hier vorliegenden Arbeit wird allerdings die hitzebedingte Umwandlung innerhalb eines Futtermittels diskutiert. Die bekanntesten MRP entstehen chemisch aus den Reaktionen mit der AS Lysin und Arginin (Arg). Aufgrund Ihrer basischen Polarität reagieren diese beiden AS besonders anfällig für die MR. Durch die MR bedingte „Blockierung“ basischer Seitenketten eines Proteins ist z.B. die proteolytische Verdaubarkeit durch das Enzym Trypsin im Dünndarm eingeschränkt (Seidowski, 2010). Auch eine Quervernetzung zwischen Proteinen oder innerhalb eines Proteins kann durch die MR entstehen. Die Quervernetzung modifiziert die Proteinstruktur derart, dass die Spaltstellen für proteolytische Enzyme umgewandelt werden und die Lösung der Verbindungen nicht mehr stattfinden kann (Oste et al., 1986; Seidowski, 2010).

Die MR findet erwartungsgemäß in proteinhaltigen Futtermitteln statt, welche gleichzeitig reduzierende Zucker enthalten und eine Erhitzung durchlaufen, wie z.B. bei der Bedampfung von Heu.

3.2. Maillard-Reaktionsprodukte im bedampften Heu

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei MRP als Indikatoren für die Reaktion bestimmt. Da die Bildung der MRP zeit- und temperaturabhängig ist, wird der Gehalt an Furosin und Carboxymethyllysin (CML) im bedampften Heu als Indikator für Ausmaß und Fortschritt des Reaktionsgeschehens herangezogen. Die unterschiedlichen Stufen der MR verlaufen gleichzeitig und unterliegen keiner strikten Reihenfolge. Dies ermöglicht eine Einschätzung der Lysin Blockierung im hier untersuchten Futtermittel. Dabei handelt es sich um die chemische Umwandlung der essentiellen AS Lysin mit einem reduzierenden Zucker. Das Furosin ist ein Laborparameter, welcher durch Salzsäurehydrolyse aus einem Amadori-Produkt z.B. Fructosyllysin entsteht. Das Amadori-Produkt (AP) stellt die initiale Stufe, sprich die frühe Phase der MR dar (Hellwig & Henle, 2014). Da die Quantifizierung der AP indirekt über die Bestimmung des Laborparameters Furosin geschieht, wird im weiteren Verlauf der Arbeit von Furosin gesprochen. Im Unterschied dazu, wird das CML als Indikator der finalen Stufe, also als fortgeschrittene Maillard-Reaktion definiert. Das in dieser Studie untersuchte CML, kann einerseits aus dem oxidativen Abbau von AP also hier Furosin, mit weiteren verfügbaren Lysinresten entstehen oder parallel aus Glyoxal und Lysin (Hellwig et al. 2015). Das heißt, es können zusätzlich zum AP (Furosin) oder direkt aus dem Furosin weitere Lysinreste zu CML umgewandelt werden. Die Einteilung der MR in unterschiedliche Stufen, erlaubt einen generellen Überblick über den Fortschritt der Reaktion (Hodge, 1953). Weitere MRP mit der AS Lysin sind z.B. Pyrralin, Hydroxymethylfurfural (HMF), Pronyl-Lysin oder das Quervernetzungsprodukt Pentosidin, welches über ein Lysinrest mit einer Pentose an einem Argininrest geknüpft ist (Förster, 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass es MR mit anderen proteinogenen AS gibt. Weitere Reaktionspartner können z.B. Arginin, Tryptophan-, Histidin-, Cystin- und Methioninseitenketten an Proteinen und Peptiden sein (Seidowski, 2010; Hellwig & Henle, 2014).

3.3. Bioverfügbarkeit von MRP

Bei der Absorption von MRP scheint die biochemische Struktur entscheidend für deren Bioverfügbarkeit zu sein (Hellwig & Henle, 2014). So sind z.B. die AS aus den AP als größter Anteil der MR für den Menschen ernährungsphysiologisch nicht verfügbar (Hellwig & Henle, 2014). Auch können Aminosäuretransporter durch MR veränderte, „glykierte“ AS nicht transportieren (Hellwig & Henle, 2014). Doch bereits 1970 zeigten Erbersdobler et al. durch die Inkubation von Fructosyllysin mit Caecum- und Dickdarminhalt von Ratten, dass eine Absorption durch die Mikrobiota geschieht. Dies konnte 2002 durch Wiame et al. für *E. coli* konkretisiert werden. Weitere Studien zeigten, dass alimentär aufgenommene MRP von unterschiedlichen Spezies durch die Mikroben resorbiert werden können. Dazu untersuchten Hellwig et al (2015) die Abbauraten von dem AP Fructosyllysin, CML und Pyrralin in Gegenwart von humaner Dickdarm Mikrobiota. Sie stellten fest, dass Fructosyllysin bei allen Probanden innerhalb von 4h Inkubation nicht mehr nachweisbar war. Die finalen MRP CML und Pyrralin unterlagen individuellen Schwankungen, welche einerseits auch auf eine unterschiedliche Nahrungsaufnahme der Probanden zurückzuführen sein könnte. In einer weiteren Studie zeigten Hellwig et al. (2019) an sechs verschiedenen *E. coli* Stämmen, dass diese in der Lage sind CML zu definierten Metaboliten abzubauen. Dies geschah aber unter der Zufuhr von Sauerstoff, von daher müssen andere anaerobe Bakterien für die Metabolisierung von CML im Dickdarm verantwortlich gewesen sein. Jedoch ist diese Studie eine der ersten die, die Entstehung bestimmter Metaboliten durch Bakterien nachweist. Es bedarf weiterer Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der Umsetzung von MRP durch die Mikrobiota, dies vor allem auch in Hinblick auf unterschiedliche Spezies. Bezogen auf die Tierart Pferd, gibt es bislang keine veröffentlichten Studien die, die Relevanz von MRP in Futtermitteln auf die Dickdarm Mikroben zeigen. Jedoch beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Quantifizierung der MRP auf den chemisch, analysierten unlöslichen Teil des Rohproteins (NDIXP), worüber sich anschließend die indirekte pcV des XP und der AS beschreiben lässt.

4. Equines Asthma und bedampftes Heu

Die Bereitstellung von hygienisch einwandfreiem Heu und Stroh stellt aufgrund der zunehmenden Temperaturschwankungen teilweise ein Problem in Deutschland dar. Diese Problematik ist einerseits durch regionale Unterschiede, die teils klimatisch bedingt die Herstellung des Futters erschweren können, und andererseits durch eine unzureichende Lagerung der Heuballen bedingt (Séguin et al., 2010; Kamphues, 2013; Routschek et al., 2014). Dies kann zu hygienisch mangelhaftem Grobfutter führen, dabei wird vor allem durch Heu und Stroh die Entstehung von Atemwegserkrankungen wie beispielsweise dem equinen Asthma (EA) gefördert, was bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen wurde (Mazan, 2015; Couëtil et al., 2016; Ivester et al., 2018; Dauvillier et al., 2019). Equiden können eine Allergie auf beispielsweise Staub und/ oder Endotoxine, welche aus anhaftenden Mikroorganismen entstehen, entwickeln (Mazan, 2015; Ivester et al., 2018; Dauvillier et al., 2019). EA stellt ein relevantes gesundheitliches Problem in der heutigen Pferdehaltung dar und sollte in erster Linie durch Fütterungs- und Haltungsoptimierung verbessert werden (Mazan, 2015). Ein Lösungsansatz dabei ist die Bedampfung von Heu.

Der Bedampfungsprozess sollte etwa eine Stunde andauern und dabei Temperaturen von ca. 100°C erreicht werden. Diese Behandlungsform führt zu einer Reduktion der anhaftenden Mikroorganismen und Staubbinding von bis zu 99 % (Moore-Colyer & Fillery, 2012; Moore-Colyer et al., 2016; Glatter et al., 2021). Die dazu durchgeführten Untersuchungen analysierten ebenfalls den Nährstoffgehalt des Heus, konzentrierten sich dabei aber auf den reinen XP Gehalt. Eine Unterteilung in lösliches und unlösliches Rohprotein erfolgte nicht. In der Studie von Glatter et al. (2021) wurde erstmals das pcvXP berechnet und eine Reduktion durch die Bedampfung festgestellt. Diese Berechnung erfolgte allerdings nur an einer einzelnen Probe. Um einen möglichen systematischen Effekt durch die Bedampfung auf den unlöslichen Teil des XP festzustellen, wurde die vorliegende Untersuchung durchgeführt.

III. PUBLIKATION

Einfluss des Bedampfens von Heu auf die geschätzte praecaecale Verdaulichkeit von Protein und Aminosäuren für Pferde

Das folgende Manuskript „Effect of hay steaming on the estimated precaecal digestibility of crude protein and selected amino acids in horses“ wurde am 10. November 2022 von dem Open Access Journal „animals“ zur Veröffentlichung angenommen.

The manuscript entitled “Effect of hay steaming on the estimated precaecal digestibility of crude protein and selected amino acids in horses” has been accepted for publication in the Open Access Journal “animals” on November 6th, 2022.

Submitted October 13th, Revised November 4th, Accepted November 6th, 2022

Article first published November 2022;

Animals **2022**, 12(22), 3092

This article belongs to the Section Animal Nutrition.

<https://doi.org/10.3390/ani12223092>

Effect of hay steaming on the estimated pre-caecal digestibility of crude protein and selected amino acids in horses

Caroline Pisch¹, Monika Wensch-Dorendorf¹, Uwe Schwarzenbolz², Thomas Henle², Jörg Michael Greef³, and Annette Zeyner¹

¹ Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Halle (Saale)

² Technische Universität Dresden, Professur für Lebensmittelchemie, Dresden

³ Federal Research Centre for Cultivated Plants, Crop and Soil Science, Julius Kühn Institute, Braunschweig

Correspondence: Prof. Dr. Annette Zeyner and Caroline Pisch

Martin Luther University Halle-Wittenberg

Institute of Agricultural and Nutritional Sciences

Group Animal Nutrition, Halle (Saale), Germany

Tel: +49 (0)345-5522716

Fax: +49 (0)345-5527050

Email: annette.zeyner@landw.uni-halle.de / caroline_pisch@landw.uni-halle.de

Keywords: hay; hay steaming; protein; protein solubility; precaecal digestible crude protein; Maillard reaction; equine asthma; horse nutrition; forage nutritive value; horse

Simple summary:

Forage contaminated with pathogenic microorganisms such as bacteria, moulds and yeasts with abiotic deposits represents a serious risk for the health of horses. Due to associated allergens, horses can develop allergic reactions, which may trigger respiratory diseases and would require drastic interventions in feeding regimens and housing conditions. Therefore, horse owners have started to treat hay with steam to achieve a reduction of inhalable allergens. However, the present study has shown that steaming led to the formation of Maillard reaction products, which decreased the proportions of precaecal digestible crude protein and precaecal digestible amino acids. As a consequence, these losses should be considered in ration calculation for horses that receive steam-treated hay.

Abstract

Steaming hay is increasingly used to treat low-quality forage because it was proven to reduce inhalable allergens such as mould spores, bacteria, and airborne dust particles. Preliminary results have shown a substantial loss of precaecal (pc) digestibility (D) of crude protein (CP) and amino acids (AA). For this purpose, six different batches of hay from central Germany were divided into four subsamples, and each one was individually steamed. Native hay and four replicates of each steamed subsample were analysed for CP, AA, neutral detergent insoluble crude protein (NDICP), neutral detergent soluble crude protein (NDSCP) as well as pepsin insoluble CP (piCP). Based on the analytical parameters, pcD of CP, protein solubility (PS), piCP (% CP) and precaecal digestible (pcd) CP and pcdAA contents were calculated. Selected Maillard reaction products (MRP), namely furosine and carboxymethyllysine (CML), were also analysed. Steaming did not affect CP content (native = 69, steamed = 67 g/kg dry matter, DM; $p > 0.05$), but it had an impact on the insoluble part of CP. Thus, NDICP increased by 57% (native = 27, steamed = 42 g/kg DM; $p < 0.05$) and piCP by 15% overall (native = 40, steamed = 46% of CP; $p < 0.05$). This could be a consequence of the heat damage and the associated increase in MRP. The content of furosine rose by 67% (native = 17.6, steamed = 29.4 mg/100 g DM; $p < 0.05$). The content of CML increased by 120% (native = 5.1,

steamed = 11.3 mg/100 g DM; $p < 0.05$). We chose to analyse these two MRPs because they represent the reaction products with the limiting AA lysine. In contrast, the soluble fractions of CP declined, while PS as a percentage of CP decreased by 38% as a result of the treatment, and NDSCP was reduced by as much as 41% ($p < 0.05$). In line with this, the steaming process decreased the pcD of CP (native = 56%, steamed = 35%; $p < 0.05$) and pcdCP (native = 37.9, steamed = 22.5 g/kg DM; $p < 0.05$), respectively. The same effects were shown for selected AA; e.g., sulphuric AA pcd methionine plus pcd cysteine decreased by 45%, pcd threonine decreased by 41%, and the limited AA pcd lysine decreased by more than 50% ($p < 0.05$). In conclusion, the high temperatures generated during steaming lead to protein damage and consequently to a reduction in the pcD of CP and essential AA. Nevertheless, steaming successfully reduces viable microorganisms and binds dust particles. Therefore, steamed hay is still a proper and sometimes the only possible roughage for horses suffering from respiratory diseases such as equine asthma. Essentially, horse diets based on steamed hay should be balanced accordingly.

1. Introduction

In horse husbandry it is a prerequisite to provide feed, especially forage, and bedding materials of high hygienic quality to ensure optimal nutrient supply and the prevention of respiratory airway diseases [1–3]. Due to a strong regional diversity in terms of soil, growth and climate circumstances, there are severe differences in the nutrient content of hay [4,5]. Different weather conditions during the conservation process and insufficient storage conditions significantly affect the hygienic quality of the feed [2,6]. Feeding hygienically inadequate hay or housing on poor straw supports the pathogenesis of chronic inflammatory respiratory disease [7–9]. The disease is considered to be non-infectious and allergic. Historically, it has been described as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), small airway disease, recurrent airway obstruction (RAO), and it is also known as “heaves” or inflammatory airway disease (IAD) [9,10]. As the disease shares several attributes with human asthma, including pathophysiological aspects and clinical presentation, the preferred term is

currently equine asthma (EA) [10]. It can be divided into mild/moderate (IAD) and severe (RAO) forms [8,11,12]. The mild and moderate form is the most common one with a total prevalence of circa 60% of the adult horse population worldwide [13]. Severe asthma is estimated to affect 10-15% of adult horses [12–14]. Today, approximately 50% of the 12–14-year-old horses housed in stables already suffer from EA in Germany [15].

Treating hay with hot steam is a highly reliable method established to reduce the viability of adherent microorganisms and to bind airborne dust with a success rate up to 99% [16–18]. Thus, this method shows good success for forage optimisation and is a long-term approach for heaves-affected horses [19]. The hay should be steamed for one hour, and a temperature of approximately 100°C should be reached in the feed. Steamed hay was stable during a test period up to 24 h when stored at 10 or 25°C, respectively [17]. This is particularly interesting regarding the possibility to prepare larger amounts of steamed hay for horses in advance. However, the authors investigated only one hay sample and showed a decrease in precaecal (pc) digestibility (D) of crude protein (CP). It has been suggested that the pcD of CP is reduced due to heat damage and thus have detrimental effects on forage quality from a nutritional point of view [17].

The aim of the present study was to determine whether steaming increases the insoluble parts of CP and the formation of Maillard reaction products (MRPs), which would indicate heat damage of feed protein. We hypothesised that high temperatures generated during steaming results in a measurable amount of protein damage and consequently reduces pcD of CP and essential amino acids (EAA), which should be considered especially for broodmares, growing horses and sport horses.

2. Materials and Methods

2.1. Study design

Samples were taken from six different batches of regionally produced hay, commonly fed to horses. These hay samples were harvested in 2020 at first cut, at the end of blossom from the typical grass-dominated meadows of Saxony-Anhalt and Saxony. Each sample comprised 16 kg of material,

which was divided into four subsamples with four kg hay in nets each. In advance of steaming, a native sample of 350 g (i.e., untreated control) was set aside. According to the manufacturer's specifications (Haygain, HG One+ for 8 kg; Farm & Stable, West Sussex, UK), the hay nets were steamed for one hour. By the end of the steaming process, a temperature indicator in the lid of the device showed an average of about 97 ± 1.1 °C. Additionally, to detect the temperature inside the hay nets, we placed a special data logger (PCE-HTD 125 data logger; PCE Instruments, Meschede, Germany) with a measurement range from -40 to 125 °C in the centre of four randomly selected hay samples. After about 8 to 10 min, there was a sudden increase in temperature, and after an average of 20 min, the temperature reached 80 °C or more. In our samples, we almost reached 100 °C after 60 min (Figure 1). Immediately after steaming, four replicates with an estimated weight of 350 g each were taken from different locations of the hay net. Subsequently, the samples were oven-dried at 40 °C for two days. The air-dried samples were coarsely pre-grounded and then ground to pass a 1 mm sieve of a laboratory sample mill (Tecator Cyclotech 093; Foss GmbH, Hamburg, Germany). For the analyses of mono- and dimeric sugars, fructans, macro elements, trace elements, amino acids (AA) and MRP, the material were pulverized using a ball mill (Mixer Mill MM 400; Retsch GmbH, Haan, Germany).

2.2. Sensory analyses

The hays' sensory properties (i.e., appearance, texture and smell) as well as the hygienic status were determined in a standardised manner following the procedure described by Kamphues et al. [1] (Table S1). Impurities were detected by eye or using a loupe [3]. Individual points were summed up and total points ranging between 0 and 20 were assigned for forage value and between 0 and -40 for hygienic status (Table S2).

2.3. Analytical Methods and Calculations

The concentrations of dry matter (DM), crude ash (CA), crude protein (CP), crude fat (CL), crude fibre (CF) and the van Soest detergent fibres

were determined according to the official German Key Book for feed analysis (VDLUFA 2012; methods no. 3.1, 4.1.1, 5.1.1 B, 6.1.1, 6.5.1, 6.5.2, 6.5.3, 8.1) [20] with a FOSS 2300 Kjeltex analyser for nitrogen. Neutral detergent fiber (aNDFom) was assayed using thermostable amylase. Neutral and acid detergent fiber (ADFom) were expressed exclusive of residual ash [21]. Neutral detergent insoluble CP (NDICP) was determined in line with Licitra et al. [22] according to VDLUFA method no. 4.13.1 [23] and used to calculate the neutral detergent-soluble and precaecal digestible (pcd) contents of dietary CP and AA, respectively [24–26]. The protein solubility (PS) was calculated as $PS = NDSCP \times 100/CP$ and the pre-caecal digestibility (pcD) of CP was calculated as $pcD = pcdCP \times 100/CP$ [26], with CP and pcdCP given in grams per kilogram of DM. Pepsin-insoluble CP (piCP) originates from protein evaluation for ruminants and is the proportion of CP that is not dissolved by treatment with HCl and pepsin. It was expressed both in absolute terms and as a percentage of CP and analysed according to VDLUFA method 4.2.1 [20]. In brief, 0.15 M HCl solution was prewarmed in a water bath up to 40 °C. Pepsin (0.7 FIP U / mg; MERCK) from pig stomach mucosa was added and dissolved. A quantity of 0.5 g of sample material was weighed into a 300 mL conical flask and 100 mL of pepsin solution was added. For about 3 min the solution was stirred on a magnetic stirrer and then incubated at 39 °C for another 16 h period. After incubation, 5 mL of 25% HCl were added. The entire mixture was filtered through an ash-free paper filter and rinsed with approximately 150 mL of distilled water. The filters were stored at room temperature for about 24 h. Subsequently, nitrogen was determined. Nitrogen was generally analysed on a FOSS 2300 Kjeltex (FOSS GmbH, Hamburg, Germany) according to VDLUFA method no. 4.1.1 (Kjeldahl method) [20]. All analyses were performed in triplicate.

The feeds' proteins were hydrolysed with hydrochloric acid and AA were analysed using a Biochrom 30 Amino Acid Analyser with PEEK Sodium Prewash Column (100 × 4.6 mm) and PEEK-Oxidised Feedstuff Column (200 × 4.6 mm) (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) according to VDLUFA method no. 4.11.1 [20]. For the analyses of tryptophan (Trp), proteins were hydrolysed with phosphoric acid and hydrochloric acid, and Trp was analysed using high performance liquid chromatography (HPLC)

and an Agilent 1100 Series unit with ZORBAX Eclipse XDB-C8 (150 × 4.6 mm, 5 µm; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) according to Fontaine et al. [27]. The measurements were performed in duplicates.

Selected Maillard reaction products were determined as follows: The amount of furosine as a precursor in the early stage Maillard reaction was quantified by reversed phase-HPLC after acid hydrolysis with 6 N HCl as reported by Krause et al. [28] with separation on a cation exchange resin column and post-column derivatisation with ninhydrin [29]. The Amadori product fructoselysine was calculated from the furosine concentration by multiplying with the transfer factor 3.1 [28,30]. Carboxymethyllysine (CML) represents a lysine-associated product of the final stage of the Maillard reaction. The concentration of CML was analysed after enzymatic digestion by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) according to Schwarzenbolz et al. [31]. All measurements were performed in duplicates.

The metabolisable energy (ME) concentration in hay was calculated based on crude nutrient analyses as recommended by the German Society of Nutrition Physiology (GfE) according to Kienzle and Zeyner [24,25]. In addition, the ME content of the hay was determined considering dynamic renal energy losses according to Kuchler et al. [32].

Macro- and trace elements were analysed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (Varian 715-ES ICP-OES) following extraction as described by Rodehutschord and Dieckmann [33].

The water-soluble carbohydrates (WSC; glucose, fructose and sucrose) were analysed by HPLC on a KONTRON Instruments unit (Tresser Instruments, Rossdorf, Germany) with refractive index detector (Shodex RI-71; Showa Denko Europe GmbH, Shodex Business, Munich, Germany) and 100 mm × 7.8 mm separation column (Rezex RPM-Monosaccharide Pb+2; Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg, Germany) [34]. Fructan were analysed via the chromatographic method according to Pavis et al. [35].

2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SAS 9.4 software package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Least square means (LSM) were estimated and compared using the following mixed linear model and

the MIXED procedure:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

in which, y_{ij} are nutrients and energy contents, μ is the general mean, α_i is the fixed effect of treatment i ($i = 0, 1$, where 0 = native hay and 1 = steamed hay), β_j is the random effect of batch j ($j = 1, \dots, 6$) and ε_{ij} is the random residual effect. Additionally, a linear regression approach was used to assess linear relationships between lysine to furosine, pcdLys to furosine, pcD of CP to piCP, pcD of CP to lysine as well as PS to furosine and PS to CML. Differences with $p < 0.05$ were considered to be significant.

3. Results

3.1. Sensory Analyses

The hays used in this study were of sensory and nutritional quality typical for Central Germany conditions. The sensory assessments are summarised in Table S1.

The first hay was macroscopically of good quality but slightly dusty. Hay two was rather straw-like, had a musty smell, was sandy and very dusty. The third hay showed a good forage quality but was heavily occupied with rodent droppings. Hay four was also very straw-like, contained many plants with a poor feed value, e.g. sorrel and many foreign seeds. Hay five and six were macroscopically of good quality but were slightly dusty and showed a slight musty odour (Table 1).

3.2. Proximate Nutrients

The native hay had a DM content of 961 g/kg, whereas it was reduced by steaming to 888 g/kg ($p < 0.001$). Contents of CA, CP, CF and ADFom were similar in the native and steamed hays (Table 2). The aNDFom content increased after steaming ($p < 0.05$; Table 2). This was also applicable to the ADL content (Table 2). Contents of WSC (i.e., glucose + fructose + sucrose) of the original hays ranged from 79 to 146 g/kg DM (data not shown). The overall effects of steaming hay on WSC content were variable and not significant. The WSC content of hays 1, 2, 3 and 5 decreased by 8, 1, 3 and 4%, respectively. The WSC content of hays 4 and 6 increased by 5 and 12%, respectively (data not shown). Similarly, the ME content did not differ

between native and steamed hay (Table 2). Following steaming, there was a significant shift within the CP and the proportion of NDICP increased by 57% on average. Thereby, the content of pcdCP decreased by 41% (Figure 2; $p < 0.001$; Table 2). This was also reflected in a reduction of pcD of CP, from native with 56% to steamed hay with 35% ($p < 0.001$; Table 2).

Pepsin-insoluble CP in percent of CP resulting from heat damage by drying, ensiling, pelleting process or in this case, by steaming, experiencing an average increase of about 15% ($p < 0.001$). In line with the reduction of pcD of CP, the AA and pcdAA are also decreasing (Figure 3; Table 2 + 3). The bar graph in Figure 3 presents the original content of selected EAA on the left side. Thereby, lysine (Lys) decreased from native to steamed hay by 24% and the sulfuric AA (SAA) in sum of methionine (Met) and cysteine (Cys) were reduced by 10% ($p < 0.001$). Only threonine did not decrease significantly. The right side of Figure 3 shows the content of the pcdAA. The pcdLys content decreased by 54% and the other pcdAA declined by more than 40% in total (pcdSAA was reduced by 45%; pcdThr was reduced by 41%; $p < 0.001$; Table 3).

3.3. Maillard Reaction Products

As a result of steaming, the early stage MRP furosine increased by 67% and the final stage MRP CML even by 120% (Figure 4; $p < 0.001$). If one relates the limited AA Lys with the MRP furosine, a negative relationship can be found ($R^2 = 0.59$) (Figure S1). In addition, the pcdLys content had a strong negative relationship to furosine ($R^2 = 0.74$) (Figure S2, Table S3). In food research and industry, furosine offers the advantage of being a direct marker for the formation of Lys-related MRPs [36]. This was confirmed by our results, but it is quite difficult to analyse these MRPs. Therefore, we were looking what the correlation between pcD of CP to furosine looks like (Figure S3) and if piCP as a percentage of CP could be an alternative. The pcD of CP was negatively correlated to furosine ($R^2 = 0.83$) as well as pcD of CP to piCP (as percentage of CP) ($R^2 = 0.84$) (Figure S4). Both relationships were significant for each individual batch (Table S3). In addition, the PS was related to the analysed MRPs both in native and steamed hays (Figure 5 and 6). The native hay showed higher PS than steamed hay. A negative correlation between PS and MRP was observed

($R^2 = 0.41$ and $R^2 = 0.45$ for furosine and $R^2 = 0.62$ and $R^2 = 0.63$ for CML in native and steamed hay, respectively) (Figure 5 and 6). The formation of MRPs thus started even at low temperatures during hay making.

3.4. Macro and Trace Elements

The calcium (Ca) concentration was slightly higher in the native hays compared with the treated ones ($p < 0.05$), whereas phosphorus (P) concentration was nearly equal (Table 2). The magnesium (Mg) concentration was lower in the steamed hay (Table 2). The treatment effect on all trace elements was negligible (Table 2).

4. Discussion

According to the sensory analyses protocol of Kamphues et al. [1], all hay samples showed small deficits in the hygienic status and also in the nutritional value. Most of them were dusty or musty and partly contaminated with rodent droppings (clear deficits). Using the system of Kamphues et al. [1], the forage value has to be judged critically, since it evaluates feed with a high leaf content to have high nutritional quality and rewards high-fibre forage with only a few points. The high leaf content of the present hays indicated high nutritive value, but horses do also need a high-fibre content in the diet. On the one hand, this is particularly important for the innate need to chew and thus reduces stereotypic behaviours such as crib biting, wood chewing or wind sucking [37,38]. On the other hand, a sufficiently long chewing time, which a high-fibre diet supports, increases alkaline saliva production and buffers acids in the stomach [37,39].

The nutrient contents of the six meadow hay samples examined in this study are listed in Table 1. These represent typical regional hay varieties for feeding horses [17,21]. That steaming hay reduces the abundance of adhering microorganisms, moulds, spores and bacteria by around 99% has been shown many times [16–18,40]. Blackman et al. [41] as well as Moore- Colyer et al. [16] have also shown that steaming hay conserves the minerals, trace elements and CP content, which is in line with the results of this study (Table 2). However, a large shift within the CP from the soluble fraction of the cell content to the insoluble fraction bound to the cell wall was observed. The NDICP, which has increased probably due to

heat damage, cannot be broken down by the enzymes of the small intestine, making the protein nutritionally unavailable to the organism. The large shift within CP must be considered and balanced in the requirement calculation for horses fed steamed hay because it has a direct negative effect on pcD of CP and AA and thus on the content of pcdCP and pcdAA. According to the feed evaluation system recommended by the GfE [25], no differences in ME concentration of untreated and treated hay appeared due to the similar crude nutrient contents. This was clearly different for pcdCP, pcdAA as well as pcD of CP and AA. The GfE recommends that a maintenance pcdCP requirement of 3 g/kg body weight^{0,75} has to be covered. That means a 600 kg warmblood-type horse should receive 365 g pcdCP daily. The native hay in the present study had a pcdCP content of 38 g/kg DM, which decreased by 41% to 23 g/kg DM in the steamed hay. Therefore, a 600 kg horse fed a hay diet only would require approximately 10 kg/d DM of native hay but 16 kg/d DM of steamed hay to meet its daily pcdCP requirement. That would mean an increase of 180 kg per month DM. Moreover, pcD of CP and AA (56% in native hay) was significantly reduced by 38% points (to 35%) after steaming. On the other hand, studies on the voluntary food intake of horses were able to show that the intake of steamed hay was higher than that of dry hay [42,43]. The large loss of pcdEAA during steaming should not be ignored. The formation of large amounts of MRPs during the steaming process might be an explanation for the reduced pcD of CP and EAA as well as decreasing pcdCP and pcdAA contents. Van Soest [44] described changes in cell wall composition due to heat treatment of feed as well as insufficient digestion of lignin-like Maillard polymers. Despite the low digestibility of the protein-bound product, further studies are necessary to clarify the bioavailability of MRP [31,45]. However, it has already been shown that colon microbes in particular are able to metabolise MRP [45–47]. We choose to analyse furosine and CML because this reaction occurs primarily at the α -amino group of free lysine residues or on the epsilon amino group of terminal peptide- or protein-bound AA, particularly at the lysine side chains of the proteins [48]. Furosine, as an early stage product of the Maillard reaction, can be used as an indicator of the extent and progress of the reaction and thus to evaluate lysine blockade [36]. However, we have also found a reduction in other AAs that are potential reactants for

the Maillard reaction, e.g. arginine, tryptophan, histidine and cysteine side chains of proteins and peptides [49]. The strong decreases of AA, pcdEAA as well as pcdCP, with a simultaneous increase of MRPs, confirmed this effect. This is extremely important. Horses can only absorb AA in the small intestine, but the AA transporters are not able to transport glycated AA [45]. According to GfE recommendations for maintenance, a 600 kg horse should receive 15 g pcdLys daily [25]. Steaming reduced pcdLys by 54% from 1.82 g/kg DM in native to 0.84 g/kg DM in steamed hay. It would therefore require an additional intake of pcdLys of approximately 117% to meet the requirements for the important limiting AA lysine. Specifically, this means that for a 600 kg horse, the owner must steam a portion of approximately 17 kg/d DM hay (= 117%) to avoid undersupply of CP and AA when feeding steamed hay. Especially for broodmares, growing horses and sport horses, the reduction of pcD of CP and AA as well as pcdCP and pcdAA must be considered and compensated [25]. Nevertheless, it should not be ignored that although the requirement for steamed hay to meet pcdCP and pcdLys increased significantly, the ME content did not vary as a result of the treatment. Consequently, the resulting elevated hay intake could lead to an oversupply of energy.

In order to assess protein damage by treatment, it could be an easier way to analyse piCP instead of MRPs. Linear regression between pcD of CP and furosine and between pcD of CP and piCP revealed an equal negative relationship. The analysis of piCP could therefore be an adequate alternative to that of specific MRPs and offers the possibility of estimating the proportion of insoluble CP that is indigestible due to heat damage.

The total WSC contents of the hay determined in this study were within the values that are typical for the region of Saxony and Saxony-Anhalt [17,21]. Steaming did not affect WSC contents to a relevant extent. Since the WSCs in native hay were already above 100 g/kg DM and were not reduced by steaming, the treatment method is not recommended for horses with metabolic disorders or laminitis-prone equids [21,50,51].

Looking to the future, the increasing energy costs in all areas should not be forgotten. The steaming process should be completed in one hour. The steam generator used in this study requires 1.5 kWh, and it was possible to treat a hay net weighing about 4 kg at a time. If a 600 kg horse

is fed this hay with an ME content of 6.9 MJ/kg DM, it would need about 9 kg/d DM of hay to meet its energy requirements. However, as described above, this is not sufficient to meet the pcdCP requirement of a hay-only diet. To meet the requirement via hay, 10 kg/d DM of native and 16 kg/d DM of steamed hay would have to be provided. Using the same device as in this study, it would take about 6 kWh per day to provide sufficient steamed hay. That means additional 180 kWh in one month.

5. Conclusion

Respiratory airway diseases, in particular the pathogenesis of equine asthma, are a massive problem in horse husbandry today. Since most triggering factors are inhalable allergens, horse owners are increasingly used to treat hygienically low-quality hay with hot steam to eliminate the viable microorganisms. The results of this study revealed that steaming elevates the insoluble part of CP with serious consequences in terms of decreasing pcD of CP and AA and thus decreasing contents of pcdCP and pcdAA. This detrimental effect can partly be attributed to heat damage. This has been indicated by increasing MRPs following steaming. However, steaming hay is still a practical method to treat hygienically inadequate hay and sometimes provides the only possible roughage for horses suffering from equine asthma. A horse's diet based on steamed hay should be appropriately balanced with particular emphasis on pcdEAA.

Author Contributions: Conceptualization, C.P. and A.Z.; investigation, C.P.; methodology, C.P., M.W.-D., U.S., T.H. and J.M.G.; supervision, A.Z.; visualization, C.P.; writing—original draft, C.P. and A.Z.; writing—review and editing, C.P., M.W.-D., U.S., T.H. and A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The experiment was performed with feed only and without animal experiments.

Data Availability Statement: All data are included in this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6. References

1. Kamphues, J.; Wolf, P.; Coenen, M.; Eder, K.; Iben, C.; Kienzle, E.; Liesegang, A.; Männer, K.; Zebeli, Q.; Zentek, J. *Supplemente Zur Tierernährung Für Studium Und Praxis*; Schlütersche, 2014; ISBN 3-7944-0241-3.
2. Séguin, V.; Lemauviel-Lavenant, S.; Garon, D.; Bouchart, V.; Gallard, Y.; Blanchet, B.; Diquelou, S.; Personeni, E.; Gauduchon, P.; Ourry, A. Effect of Agricultural and Environmental Factors on the Hay Characteristics Involved in Equine Respiratory Disease. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 2010, 135, 206–215, doi:10.1016/j.agee.2009.09.012.
3. Intemann, S.; Reckels, B.; Schubert, D.; Wolf, P.; Kamphues, J.; Visscher, C. The Hygienic Status of Different Forage Types for Horses—A Retrospective Study on Influencing Factors and Associations with Anamnestic Reports. *Veterinary Sciences* 2022, 9, 226, doi:10.3390/vetsci9050226.
4. Routschek, A.; Schmidt, J.; Kreienkamp, F. Impact of Climate Change on Soil Erosion — A High-Resolution Projection on Catchment Scale until 2100 in Saxony/Germany. *CATENA* 2014, 121, 99–109, doi:10.1016/j.catena.2014.04.019.
5. Olesen, J.E.; Børgesen, C.D.; Elsgaard, L.; Palosuo, T.; Rötter, R.P.; Skjelvåg, A.O.; Peltonen-Sainio, P.; Börjesson, T.; Trnka, M.; Ewert, F. Changes in Time of Sowing, Flowering and Maturity of Cereals in Europe under Climate Change. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2012, 29, 1527–1542.
6. Bridge, P.; Spooner, B. *Soil Fungi: Diversity and Detection. In Interactions in the Root Environment: An Integrated Approach*; Powlson, D.S., Bateman, G.L., Davies, K.G., Gaunt, J.L., Hirsch, P.R., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2002; pp. 147–154 ISBN 978-94-010-3925-3.
7. Ivester, K.M.; Couëtil, L.L.; Moore, G.E. An Observational Study of Environmental Exposures, Airway Cytology, and Performance in Racing Thoroughbreds. *J Vet Intern Med* 2018, 32, 1754–1762,

doi:10.1111/jvim.15226.

8. Bullone, M.; Lavoie, J.-P. The Equine Asthma Model of Airway Remodeling: From a Veterinary to a Human Perspective. *Cell Tissue Res* 2020, 380, 223–236, doi:10.1007/s00441-019-03117-4.

9. Couëtil, L.L.; Cardwell, J.M.; Gerber, V.; Lavoie, J. -P.; Léguillette, R.; Richard, E.A. Inflammatory Airway Disease of Horses—Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 2016, 30, 503–515, doi:10.1111/jvim.13824.

10. Couetil, L.; Cardwell, J.M.; Leguillette, R.; Mazan, M.; Richard, E.; Bienzle, D.; Bullone, M.; Gerber, V.; Ivester, K.; Lavoie, J.-P.; et al. Equine Asthma: Current Understanding and Future Directions. *Front. Vet. Sci.* 2020, 7, 450, doi:10.3389/fvets.2020.00450.

11. Bond, S.; Léguillette, R.; Richard, E.A.; Couetil, L.; Lavoie, J.-P.; Martin, J.G.; Pirie, R.S. Equine Asthma: Integrative Biologic Relevance of a Recently Proposed Nomenclature. *J Vet Intern Med* 2018, 32, 2088–2098, doi:10.1111/jvim.15302.

12. Rossi, H. C. 2020.

13. Davis, K.U. Investigation of the Pathophysiology and a Novel Therapeutic Target of Equine Asthma Syndrome; North Carolina State University, 2020; ISBN 9798664735918.

14. White, S.J.; Moore-Colyer, M.; Marti, E.; Hannant, D.; Gerber, V.; Coüetil, L.; Richard, E.A.; Alcocer, M. Antigen Array for Serological Diagnosis and Novel Allergen Identification in Severe Equine Asthma. *Sci Rep* 2019, 9, 15170, doi:10.1038/s41598-019-51820-7.

15. Lehmann, B.; Merle, R.; Klier, J.; Gehlen, H. Besitzerbefragung zur chronisch-obstruktiven Bronchitis bei Warmblütern unter Verwendung eines Online-Fragebogens. 2016, 11.

16. Moore-Colyer, M.J.S.; Taylor, J.L.E.; James, R. The Effect of Steaming and Soaking on the Respirable Particle, Bacteria, Mould, and Nutrient Content in Hay for Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 2016, 39, 62–68, doi:10.1016/j.jevs.2015.09.006.

17. Glatter, M.; Bochnia, M.; Wensch-Dorendorf, M.; Greef, J.M.; Zeyner, A. Feed Intake Parameters of Horses Fed Soaked or Steamed Hay and Hygienic Quality of Hay Stored Following Treatment. *Animals* 2021, 11, 2729, doi:10.3390/ani11092729.
18. Moore-Colyer, M.J.S.; Fillery, B.G. The Effect of Three Different Treatments on the Respirable Particle Content, Total Viable Count and Mould Concentrations in Hay for Horses. In *Forages and grazing in horse nutrition*; Springer, 2012; pp. 101–106.
19. Gerber, V.; Lindberg, Å.; Berney, C.; Robinson, N. e. Airway Mucus in Recurrent Airway Obstruction– Short-Term Response to Environmental Challenge. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2004, 18, 92–97, doi:10.1111/j.1939-1676.2004.tb00140.x.
20. VDLUFA. Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln Methodenbuch. 3rd Ed. Darmstadt, Germany: VDLUFA-Verlag; 2012.
21. Bochnia, M.; Pietsch, C.; Wensch-Dorendorf, M.; Greef, M.; Zeyner, A. Effect of Hay Soaking Duration on Metabolizable Energy, Total and Prececal Digestible Crude Protein and Amino Acids, Non-Starch Carbohydrates, Macronutrients and Trace Elements. *Journal of Equine Veterinary Science* 2021, 101, 103452, doi:10.1016/j.jevs.2021.103452.
22. Licitra, G.; Hernandez, T.M.; Van Soest, P.J. Standardization of Procedures for Nitrogen Fractionation of Ruminant Feeds. *Animal Feed Science and Technology* 1996, 57, 347–358, doi:10.1016/0377-8401(95)00837-3.
23. VDLUFA 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), Band III. Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln. 2016.
24. Kienzle, E.; Zeyner, A. The Development of a Metabolizable Energy System for Horses: ME System for Horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2010, 94, e231–e240, doi:10.1111/j.1439-

0396.2010.01015.x.

25. Gesellschaft Für Ernährungsphysiologie. Empfehlungen Zur Energie- Und Nährstoffversorgung von Pferden. In Energie-Und Nährstoffbedarf Landwirtschaftlicher Nutztiere; DLG-Verlag: Frankfurt, Germany, 2014; Volume 11.;
26. Zeyner, A.; Kirchhof, S.; Susenbeth, A.; Südekum, K.-H.; Kienzle, E. A New Protein Evaluation System for Horse Feed from Literature Data*. *Journal of Nutritional Science* 2015, 4, doi:10.1017/jns.2014.66.
27. Fontaine, J.; Bech-Andersen, S.; Butikofer, U.; Froidmont-Gortz, I. de 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 (Germany)* 1998.
28. Krause, R.; Knoll, K.; Henle, T. Studies on the Formation of Furosine and Pyridosine during Acid Hydrolysis of Different Amadori Products of Lysine. *Eur Food Res Technol* 2003, 216, 277–283, doi:10.1007/s00217-002-0649-0.
29. Henle, T.; Walter, H.; Krause, I.; Klostermeyer, H. Efficient Determination of Individual Maillard Compounds in Heat-Treated Milk Products by Amino Acid Analysis. *International Dairy Journal* 1991, 1, 125–135, doi:10.1016/0958-6946(91)90004-R.
30. Förster, A. *Quantitative Studien Zu Vorkommen Und Metabolischem Transit Alimentärer Maillard-Reaktions-Produkte*. 2006.
31. Schwarzenbolz, U.; Hofmann, T.; Sparmann, N.; Henle, T. Free Maillard Reaction Products in Milk Reflect Nutritional Intake of Glycated Proteins and Can Be Used to Distinguish “Organic” and “Conventionally” Produced Milk. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 5071–5078, doi:10.1021/acs.jafc.6b01375.
32. Kuchler, M.; Zeyner, A.; Susenbeth, A.; Kienzle, E. The Effect of Crude Protein Content of the Diet on Renal Energy Losses in Horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2020, 104, 1494–1500, doi:10.1111/jpn.13377.

33. Rodehutscord, M.; Dieckmann, A. Comparative Studies with Three-Week-Old Chickens, Turkeys, Ducks, and Quails on the Response in Phosphorus Utilization to a Supplementation of Monobasic Calcium Phosphate¹. *Poultry Science* 2005, 84, 1252–1260, doi:10.1093/ps/84.8.1252.
34. Bachmann, M.; Glatter, M.; Bochnia, M.; Greef, J.M.; Breves, G.; Zeyner, A. Degradation of Monosaccharides, Disaccharides, and Fructans in the Stomach of Horses Adapted to a Prebiotic Dose of Fructooligosaccharides and Inulin. *Journal of Equine Veterinary Science* 2021, 105, 103731, doi:10.1016/j.jevs.2021.103731.
35. Pavis, N.; Chatterton, N.J.; Harrison, P.A.; Baumgartner, S.; Praznik, W.; Boucaud, J.; Prud'homme, M.P. Structure of Fructans in Roots and Leaf Tissues of *Lolium Perenne*. *New Phytologist* 2001, 150, 83–95, doi:10.1046/j.1469-8137.2001.00069.x.
36. Erbersdobler, H.F.; Somoza, V. Forty Years of Furosine – Forty Years of Using Maillard Reaction Products as Indicators of the Nutritional Quality of Foods. *Molecular Nutrition & Food Research* 2007, 51, 423–430, doi:10.1002/mnfr.200600154.
37. Sarrafchi, A.; Blokhuis, H.J. Equine Stereotypic Behaviors: Causation, Occurrence, and Prevention. *Journal of Veterinary Behavior* 2013, 8, 386–394, doi:10.1016/j.jveb.2013.04.068.
38. Moeller, B.A.; McCall, C.A.; Silverman, S.J.; McElhenney, W.H. Estimation of Saliva Production in Crib-Biting and Normal Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 2008, 28, 85–90, doi:10.1016/j.jevs.2008.01.006.
39. Merritt, A.M.; Julliand, V. Gastrointestinal Physiology. *Equine applied and clinical nutrition: health, welfare and performance* 2013, 3–32.
40. Earing, J.E.; Hathaway, M.R.; Sheaffer, C.C.; Hetchler, B.P.; Jacobson, L.D.; Paulson, J.C.; Martinson, K.L. Effect of Hay Steaming on Forage Nutritive Values and Dry Matter Intake by Horses¹. *Journal of Animal Science* 2013, 91, 5813–5820, doi:10.2527/jas.2013-6333.
41. Blackman, M.; Moore-Colyer, M.J.S. Hay for Horses: The Effects of

Three Different Wetting Treatments on Dust and Nutrient Content. *Animal Science* 1998, 66, 745–750.

42. Brown, E.; Tracey, S.; Gowers, I. An Investigation to Determine the Palatability of Steamed Hay, Dry Hay and Haylage. *Pro. BSAS Innovation from Animal Science a necessity not an option* 2013, 4, 104.

43. Moore-Colyer, M.J.S.; Payne, V. Palatability and Ingestion Behaviour of 6 Polo Ponies Offered a Choice of Dry, Soaked and Steamed Hay for 1 Hour on Three Separate Occasions. *Pro. BSAS Nottingham UK* 2012.

44. van Soest, P.J.; Mason, V.C. The Influence of the Maillard Reaction upon the Nutritive Value of Fibrous Feeds. *Animal Feed Science and Technology* 1991, 32, 45–53, doi:10.1016/0377-8401(91)90008-G.

45. Hellwig, M.; Henle, T. Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. *Angewandte Chemie International Edition* 2014, 53, 10316–10329, doi:10.1002/anie.201308808.

46. Wiame, E.; Delpierre, G.; Collard, F.; Van Schaftingen, E. Identification of a Pathway for the Utilization of the Amadori Product Fructoselysine in *Escherichia Coli*. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277, 42523–42529, doi:10.1074/jbc.M200863200.

47. Erbersdobler, H.; Gunsser, I.; Weber, G. Abbau von Fruktoselysin Durch Die Darmflora. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 1970, 17, 573–575.

48. Tuohy, K.M.; Hinton, D.J.S.; Davies, S.J.; Crabbe, M.J.C.; Gibson, G.R.; Ames, J.M. Metabolism of Maillard Reaction Products by the Human Gut Microbiota – Implications for Health. *Molecular Nutrition & Food Research* 2006, 50, 847–857, doi:10.1002/mnfr.200500126.

49. Thornalley, P.J. Protein and Nucleotide Damage by Glyoxal and Methylglyoxal in Physiological Systems - Role in Ageing and Disease. *Drug Metabol Drug Interact* 2008, 23, 125–150.

50. Longland, A.C.; Barfoot, C.; Harris, P.A. Effect of Period, Water Temperature and Agitation on Loss of Water-Soluble Carbohydrates and Protein from Grass Hay: Implications for Equine Feeding Management.

Veterinary Record 2014, 174, 68–68, doi:10.1136/vr.101820.

51. Longland, A.C.; Barfoot, C.; Harris, P.A. Effects of Soaking on the Water-Soluble Carbohydrate and Crude Protein Content of Hay. *Veterinary Record* 2011, 168, 618–618, doi:10.1136/vr.d157.

Table 1. Results for sensory analysis of each hay sample according to Kamphues et al. [1].

Hay sample	Forage value	Points	Hygienic status	Points
Hay 1	satisfying (dusty)		flawless	
Hay 2	very low (straw-like, dusty)	13	clear deficits (musty, sandy)	0
Hay 3	satisfying	3	clear deficits (rodent droppings)	- 8
Hay 4	moderate (straw-like)	15	small deficits	- 7
Hay 5	satisfying	6	small deficits	- 2
Hay 6	satisfying	10	small deficits	- 5
	satisfying	11	small deficits	- 5

Table 2. Least square means and standard error (SE) of analysed nutrients, including calculated contents of pcdCP, pcD of CP, pcdEAA and metabolisable energy depending on the treatment (native or steamed)

Item	Unit	Treatment		SE	p-value
		Native	Steamed		
DM	[g/kg]	961	888	± 3.4	<0.001
CA	[g/kg DM]	62	61	± 3.7	0.551
CP	[g/kg DM]	69	67	± 7.7	0.290
CL	[g/kg DM]	8	9	± 0.8	0.352
CF	[g/kg DM]	330	334	± 15.2	0.411
aNDFom	[g/kg DM]	673	695	± 18.5	<0.001
ADFom	[g/kg DM]	371	372	± 14.9	0.869
ADL	[g/kg DM]	49	52	± 3.2	0.003
NDICP	[g/kg DM]	27	42	± 5.0	<0.001
NDSCP	[g/kg DM]	42	25	± 2.8	<0.001
pcdCP ^a	[g/kg DM]	38	23	± 2.6	<0.001
piCP	[g/kg DM]	27	31	± 3.4	<0.001
pcD of CP ^a	[% of CP]	56	35	± 2.0	<0.001
PS ^a	[% of CP]	62	38	± 2.3	<0.001
piCP	[% of CP]	40	46	± 1.3	<0.001
glucose	[g/kg DM]	13	11	± 1.7	0.001
fructose	[g/kg DM]	25	25	± 3.2	0.838
sucrose	[g/kg DM]	9	11	± 1.9	0.009
fructans	[g/kg DM]	65	67	± 9.3	0.220
total WSC	[g/kg DM]	113	113	± 12.7	0.709
CML	[mg/100g DM]	5.1	11.3	± 1.61	<0.001
furosine	[mg/100g DM]	17.6	29.4	± 5.46	<0.001

Table 2. (continued)

Item	Unit	Treatment		SE	p-value
		Native	Steamed		
P	[g/kg DM]	1.84	1.83	± 0.139	0.878
Ca	[g/kg DM]	3.99	3.66	± 0.317	0.011
K	[g/kg DM]	13.51	13.68	± 2.214	0.634
Na	[g/kg DM]	0.09	0.07	± 0.044	0.108
Mg	[g/kg DM]	1.37	1.31	± 0.126	0.034
Zn	[mg/kg DM]	38.65	39.37	± 13.159	0.493
Mn	[mg/kg DM]	114.06	120.53	± 45.260	0.060
Cu	[mg/kg DM]	4.54	4.58	± 0.572	0.766
Fe	[mg/kg DM]	142.73	180.10	± 34.178	0.061
ME ^b	[MJ/kg DM]	6.9	6.9	± 0.3	0.648
ME mod. ^c	[MJ/kg DM]	6.8	6.8	± 0.3	0.599

DM, dry matter; CA, crude ash; CP, crude protein; CL, crude fat; CF, crude fibre; aNDFom, neutral detergent fibre treated with a heat-stable amylase and expressed exclusive of residual ash; ADFom, acid detergent fibre, expressed exclusive of residual ash; ADL, acid detergent lignin; ME, metabolizable energy; NDICP, neutral-detergent insoluble CP; NDSCP, neutral-detergent soluble CP; pcdCP, pre-caecal digestible CP; pcD of CP, pre-caecal digestibility of CP; PS, protein solubility; piCP, pepsin-insoluble CP; total WSC, water soluble carbohydrates in sum of glucose, fructose, sucrose, fructans; CML, carboxymethyllysine;

^a calculated according to GfE [25] and Zeyner et al. [26],

^b calculated according to Kienzle and Zeyner [24] and GfE [25]

^c calculated according to Kuchler et al. [32]

Table 3. Least square means and standard error (SE) of the analysed contents of essential and non-essential amino acids (AA) in meadow hay depending on treatment (native or steamed).

	treatment of hay							
	native		steamed		SE		p-value	
	g/kg	g/16g	g/kg	g/16g	g/kg	g/16g	g/kg	g/16g
	DM	N	DM	N	DM	N	DM	N
Essential amino acids								
Histidine	1.1	1.6	1.0	1.4	± 0.12	± 0.06	<0.001	<0.001
Isoleucine	2.9	4.1	2.8	4.1	± 0.34	± 0.10	0.367	0.393
Leucine	5.2	7.6	5.1	7.4	± 0.61	± 0.17	0.189	0.229
Lysine	3.3	4.8	2.5	3.7	± 0.30	± 0.10	<0.001	<0.001
Methionine	1.2	1.7	1.1	1.6	± 0.13	± 0.04	0.003	0.011
Phenylalanine	3.2	4.6	3.1	4.5	± 0.41	± 0.14	0.133	0.085
Threonine	3.0	4.4	2.9	4.3	± 0.34	± 0.08	0.155	0.176
Tryptophan	0.9	1.3	0.9	1.3	± 0.12	± 0.05	0.047	0.007
Valine	3.6	5.3	3.5	5.2	± 0.43	± 0.10	0.253	0.263
Non-essential amino acids								
Alanine	4.3	6.2	4.1	6.0	± 0.51	± 0.14	0.133	0.147
Arginine	3.5	5.0	3.2	4.6	± 0.38	± 0.09	<0.001	<0.001
Aspartic acid	6.1	8.7	5.8	8.4	± 0.74	± 0.20	0.091	0.034
Aspartic acid	0.7	1.1	0.6	0.9	± 0.05	± 0.05	<0.001	<0.001
Cysteine	7.1	10.2	6.8	9.9	± 0.82	± 0.17	0.112	0.090
Glutamic acid	3.6	5.2	3.5	5.1	± 0.41	± 0.09	0.228	0.307
Glycine	4.0	5.6	3.9	5.5	± 0.68	± 0.41	0.622	0.525
Proline	2.9	4.2	2.8	4.1	± 0.32	± 0.07	0.069	0.074
Serine	2.1	3.0	1.9	2.8	± 0.22	± 0.08	0.006	0.005
Tyrosine								
pre-caecal digestible AA^a								
pcdLys	1.82		0.84		± 0.103		<0.001	
pcdMet	0.63		0.36		± 0.043		<0.001	
pcdCys	0.40		0.21		± 0.018		<0.001	
pcdSAA	1.03		0.57		± 0.058		<0.001	
pcdThr	1.65		0.97		± 0.112		<0.001	

pcdLys, pre-caecal digestible lysine; pcdMet, pre-caecal digestible methionine; pcdCys, pre-caecal digestible cysteine; pcdSAA, pre-caecal digestible sulfuric amino acids; pcdThr, pre-caecal digestible threonine;

^a calculated according to GfE [25] and Zeyner et al. [26]

Table S 1. Evaluation of the hygienic status of hay by sensory analysis in accordance with Kamphues et al. [1].

Parameters	nutritional value		hygienic status	
	Findings	points deducted	findings	points deducted
Texture	soft and leafy ((a lot) inflorescence)	10	dry	0
	low-leaved	7	slightly clammy	-2
	very low leaved	5	clammy, moist	-5
	stem-rich	2		
	(inflorescences)			
	strawy (deflowered)	0		
Odor	aromatic (typically)	3	unremarkable	0
	lightly aromatic / mouldy	1	musty nuances	-5
	flat / rotten	0	mouldy / putrid	-10
Colour	nice green	5	product - typical	0
	slightly discoloured	3	focally grey, whitish	-2
	strongly discoloured	1	diffusely discoloured	-5
Impurities	macroscopic free	2	none	0
	low sand/ soil content	1	medium grade	-5
	high sand/ soil content (turf, root mass, etc.)	0	high grade	-10
Note:	possibly evaluate the proportion of plants with low forage value (thistles/honeysuckle)	-5 to -10	Containing waste material. poisonous plants, plant parts altered by disease	-5 to -10

Table S 2. Evaluation of forage value and hygienic status according to Kamphues et al. [1].

nutritional value	points	hygienic status	points
very good	20 – 16	flawless	0
satisfying	15 – 10	small deficits	-1 to -5
moderate	9 – 5	clear deficits	-6 to -10
very low (strawy)	4 – 0	massive deficits	-11 to -40

Table S 3. Linear regression for individual batch of hay with R2 and significance p-value

x	furosine	furosine	furosine	pcD of CP	pcD of CP	pcD of CP	pcD of CP	pcD of CP
y	lys	pcdLYS	pcdLYS	piCP	piCP	piCP	piCP	piCP
batch	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p
1	0.7199	0.008	0.7884	0.003	0.8997	<0.001	0.7919	0.003
2	0.0255	0.706	0.3104	0.151	0.8722	0.001	0.5072	0.048
3	0.9142	<0.001	0.9663	<0.001	0.885	<0.001	0.9652	<0.001
4	0.854	0.001	0.9538	<0.001	0.9533	<0.001	0.9897	<0.001
5	0.1155	0.410	0.4676	0.062	0.6023	0.024	0.7686	0.004
6	0.9322	0.001	0.9781	<0.001	0.8028	0.003	0.957	<0.001
mean	0.59		0.74		0.84		0.83	

x, x-axis; y, y-axis; Lys, lysine [g/kg DM]; furosine [mg/100g DM]; pcdLYS, pre-caecal digestible lysine [g/kg DM]; pcD of CP, pre-caecal digestibility of CP [% CP]; piCP, pepsin insoluble CP [% CP]

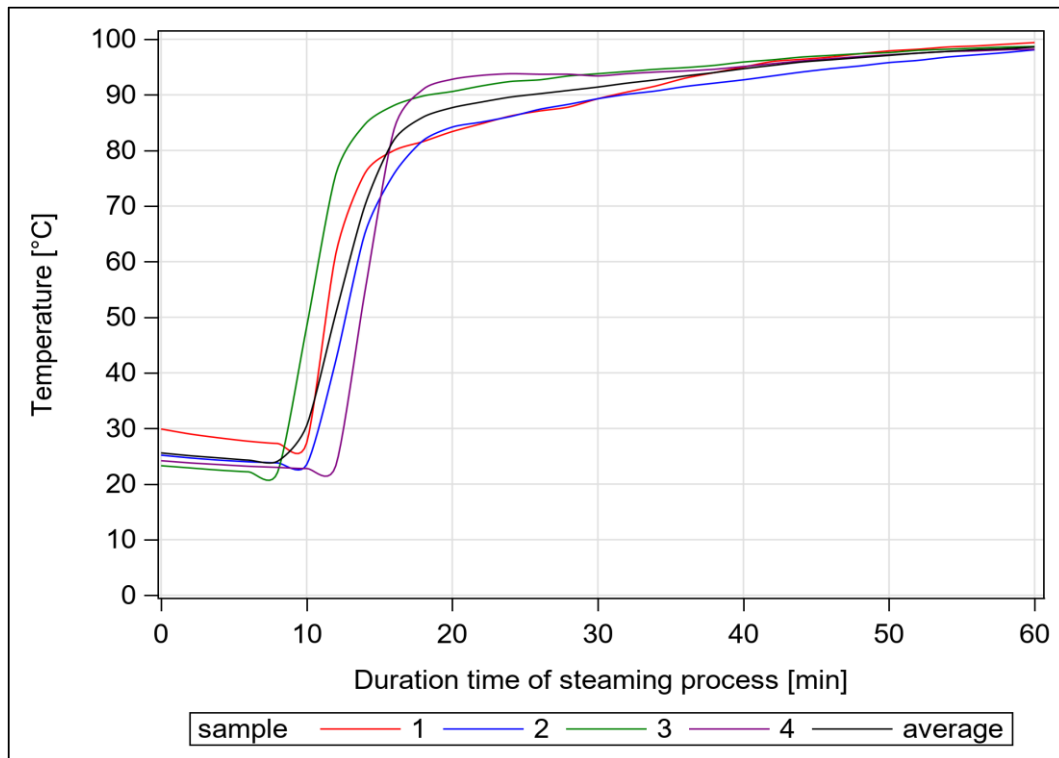


Figure 1. Rise of temperature inside the tested hay nets during steaming in a Haygain One. Specifications are given in the text.

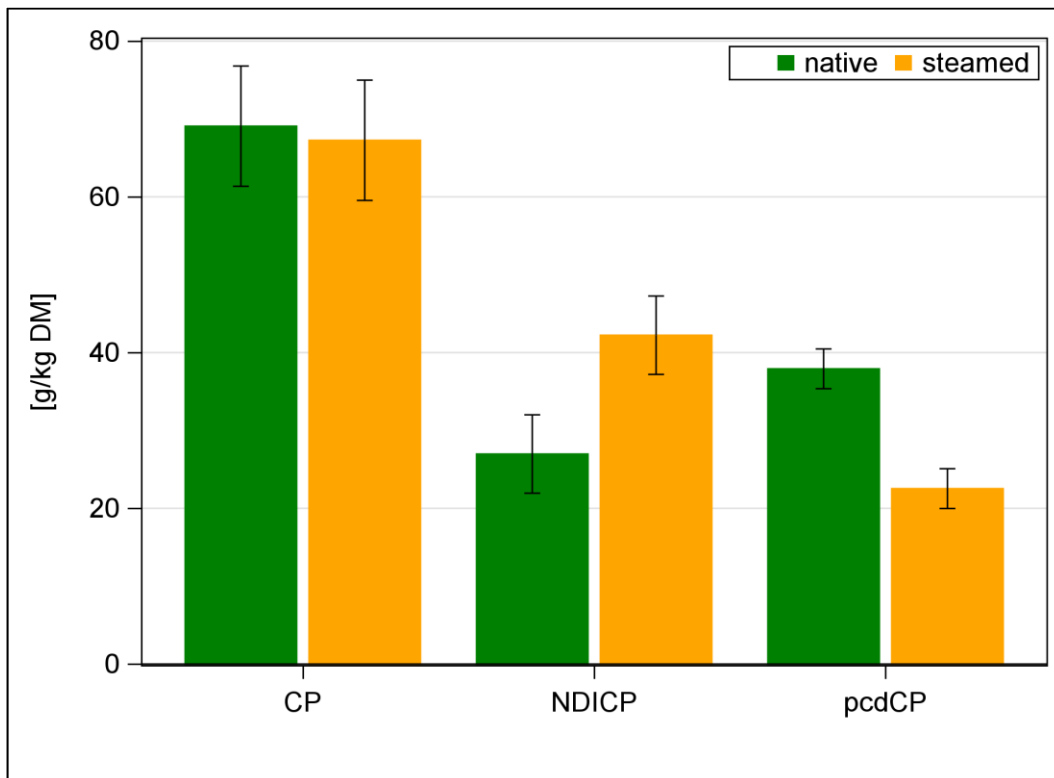


Figure 2. Contents of crude protein (CP), neutral detergent insoluble CP (NDICP) and precaecal digestible CP (pcdCP) in native (green bars) and steamed hay (orange bars); *with $p < 0.05$ significant differences of means.

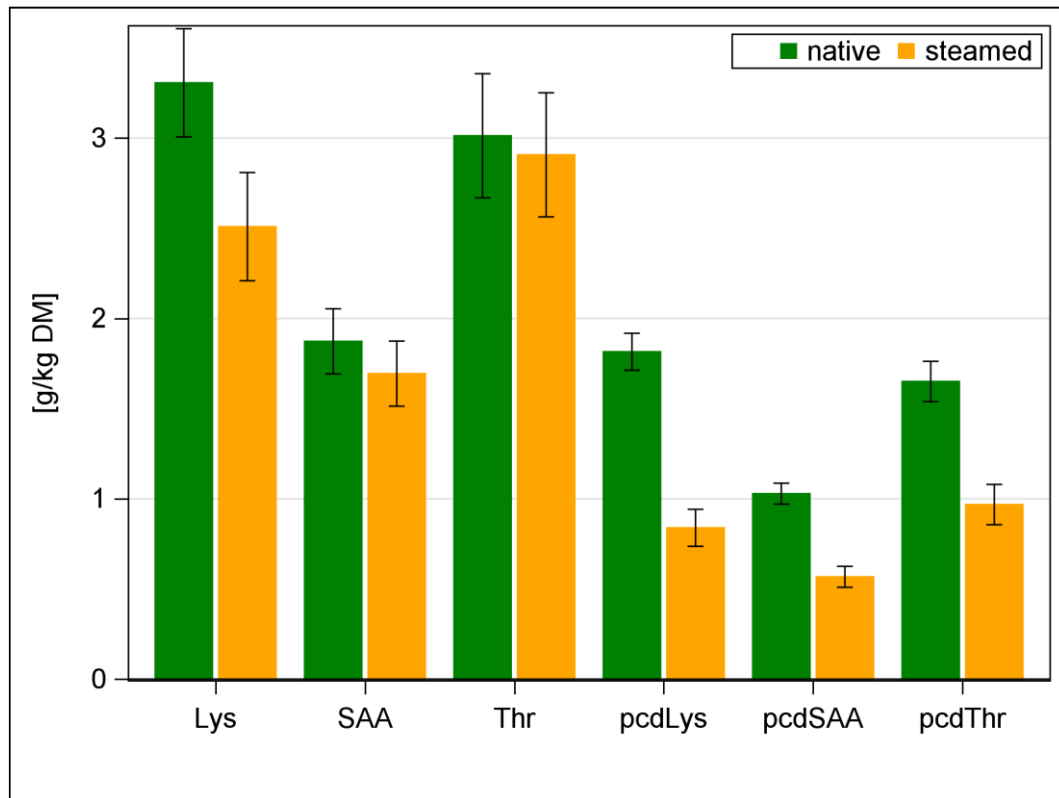


Figure 3. Contents of selected essential amino acids (EAA) and precaecal digestible EAA (pcdEAA) in native (green bars) and steamed hay (orange bars); *with $p < 0.05$ significant differences of means; Lys = lysine, SAA = sulfuric amino acids (i.e., methionine + cysteine), Thr = threonine.

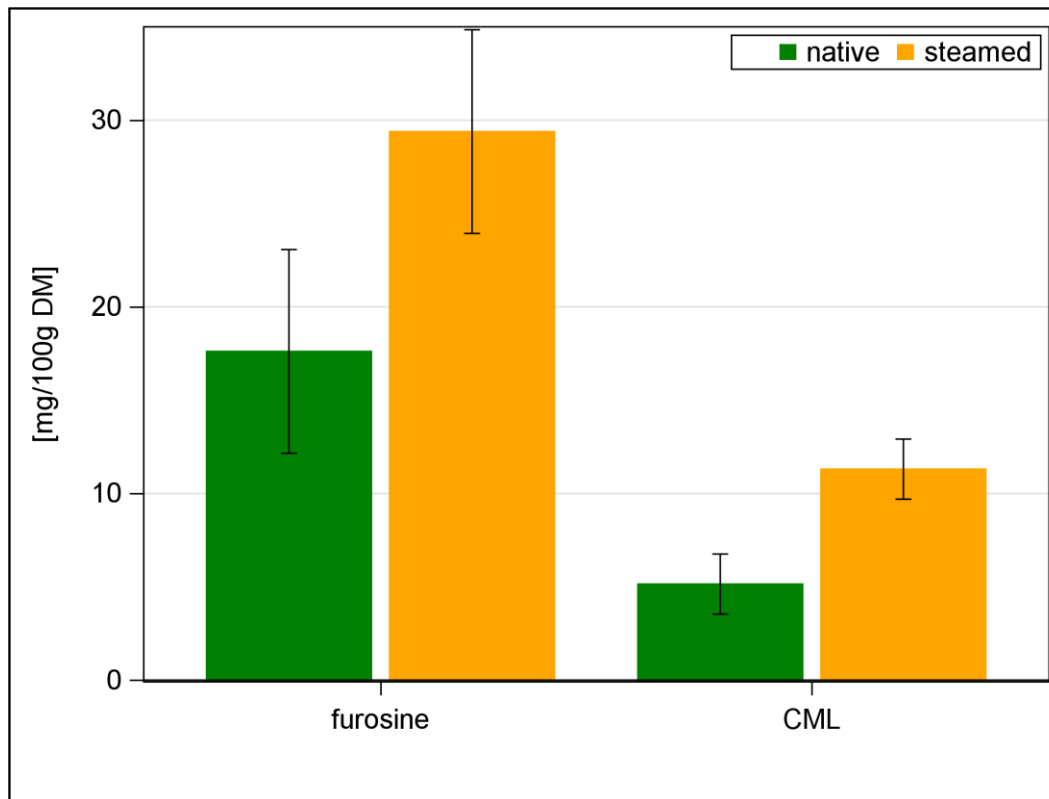


Figure 4. Maillard reaction products in native and steamed hay (*with $p < 0.05$ significant differences of means).

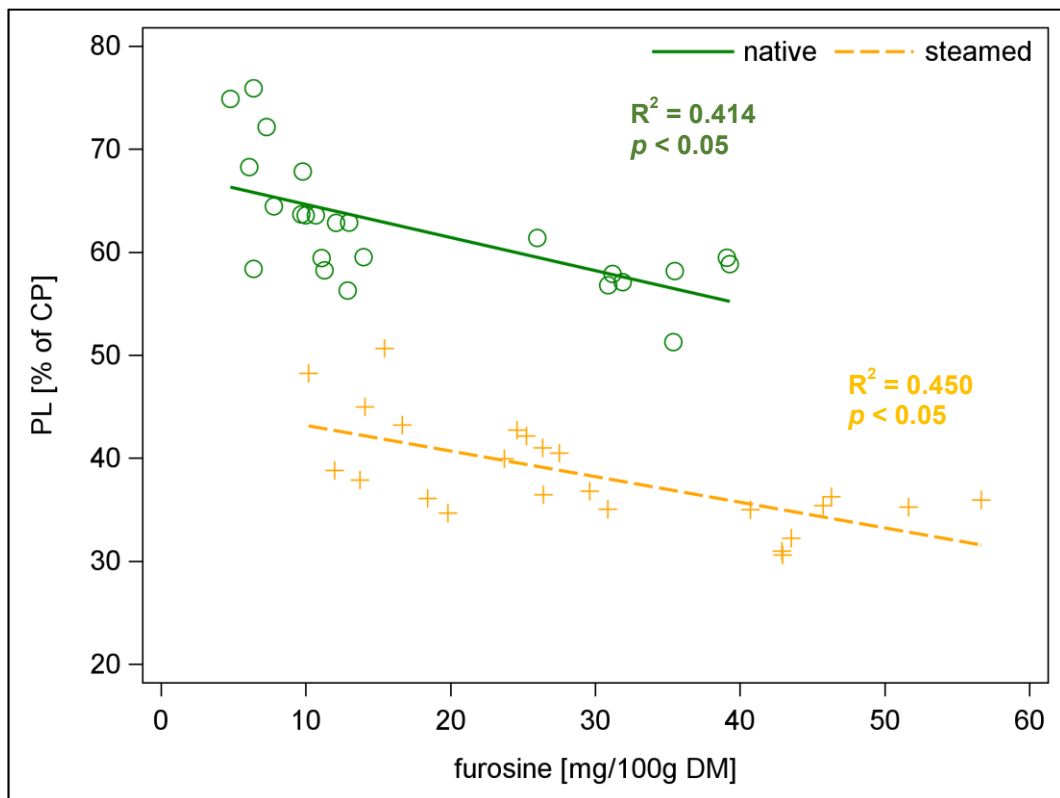


Figure 5. Linear relationship between protein solubility [% CP] and furosine [mg/100 g DM] in native and steamed hay.

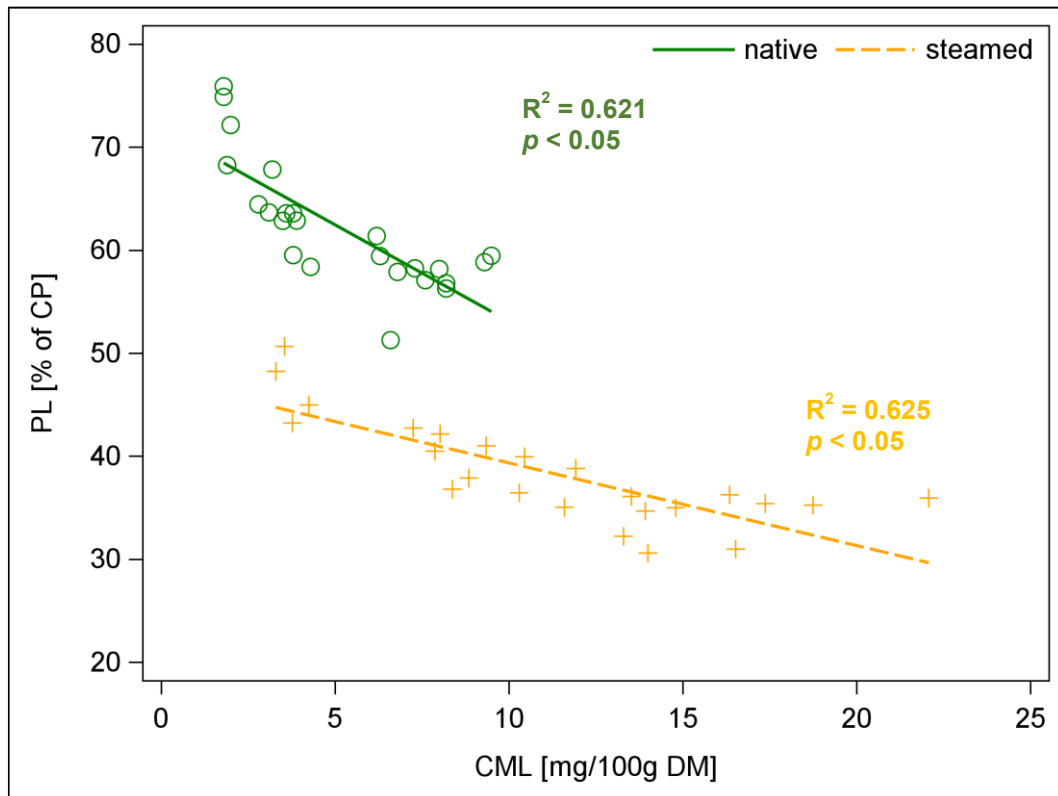


Figure 6. Linear relationship between protein solubility [% CP] and CML [mg/100g DM] in native and steamed hay; CML = carboxymethyllysine.

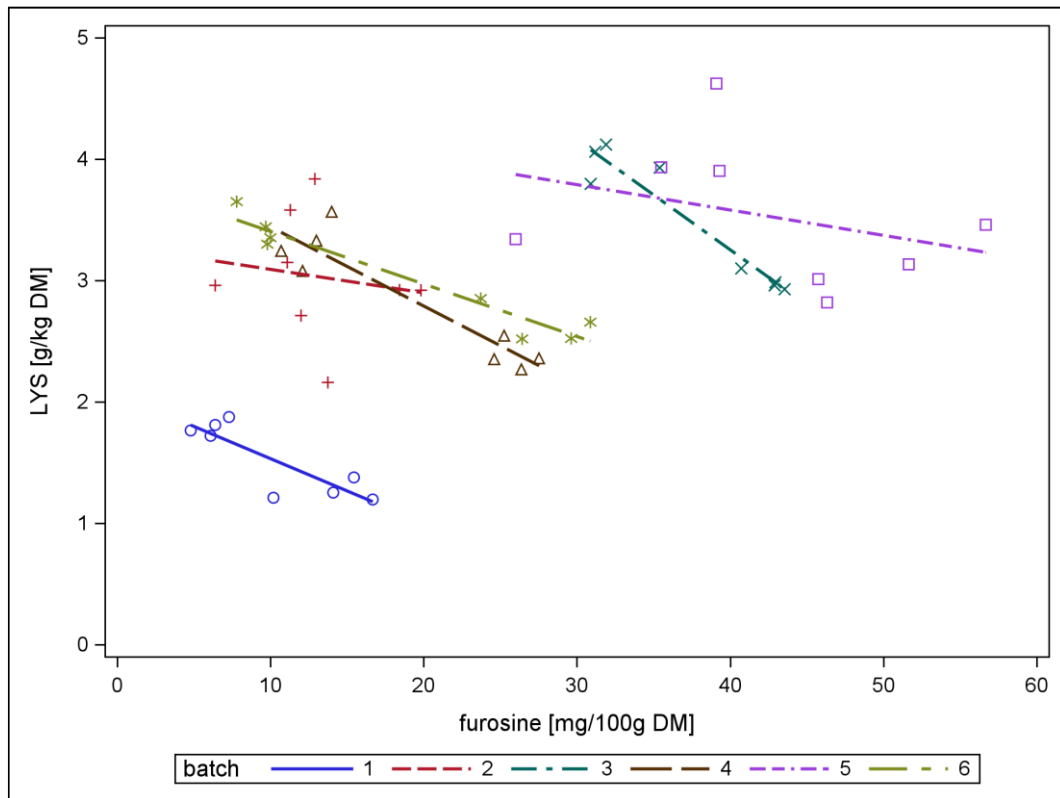


Figure S 1. Lysine [g/kg DM] compared to furosine [mg/100g DM]

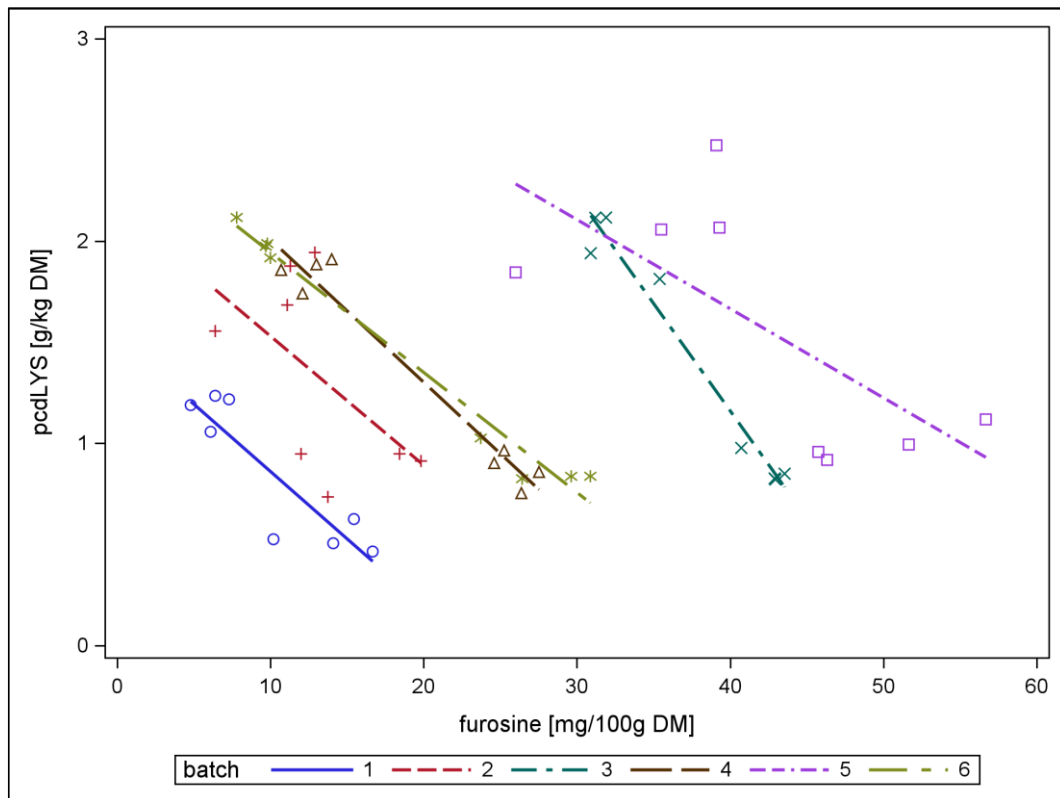


Figure S 2. pcdLys [g/kg DM] compared to furosine [mg/100g DM]

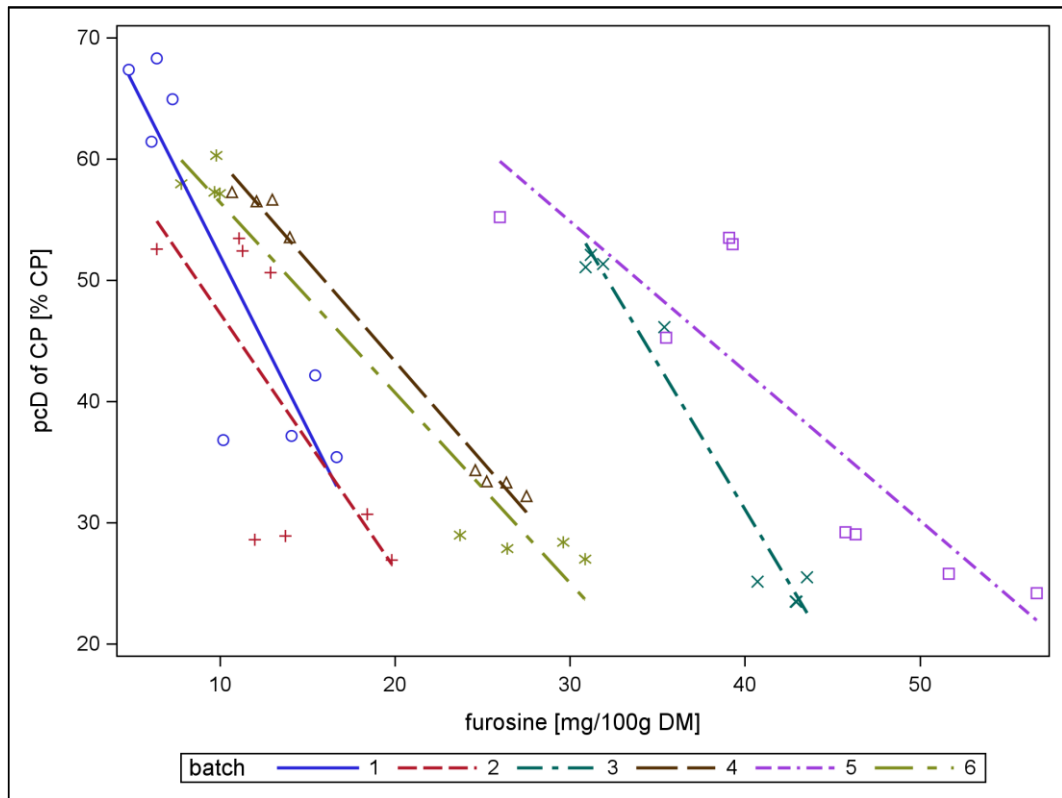


Figure S 3. pcD of CP in [% CP] compared to furosine [mg/100g DM]

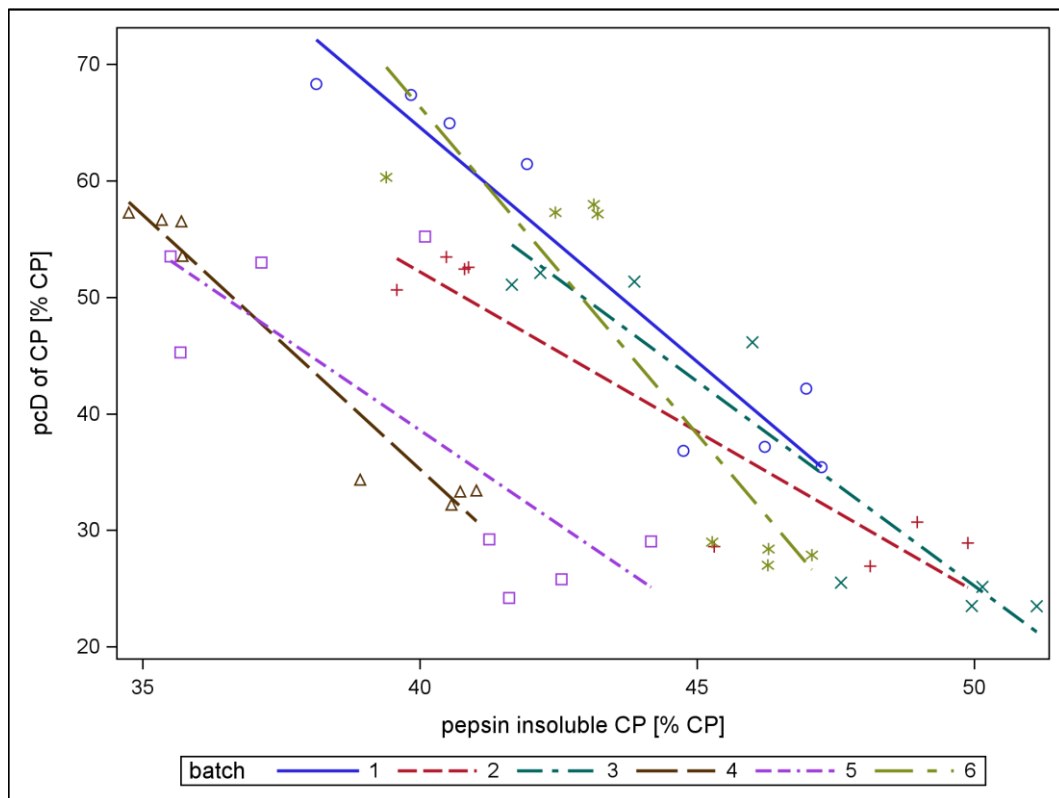


Figure S 4. pcD of CP in [% CP] compared to piCP in [% CP]

IV. DISKUSSION

Die Heuproben welche in dieser Studie zur Verfügung standen, entsprachen den regulär späten Ernteschnitten für Mitteldeutschland und waren zur Fütterung von Pferden vorgesehen. In der sensorischen Futterwert- bzw. Hygieneprüfung nach Kamphues & Meyer (2014) zeigten allerdings alle Proben Defizite. Zum Beispiel wurde Charge 2 im Futterwert und Hygienestatus mit deutlichen Mängeln bewertet. Diese zeigte starke Verholzungen, einen muffigen Geruch, war sandig sowie staubig. Die Charge 3 bekam die höchste Punktzahl im Futterwert wurde aber aufgrund von Nagerkot-Beimengungen mit deutlichen Einbußen im Hygienestatus benotet. Diese beiden Beispiele verdeutlichen schon die Probleme in der Pferdehaltung. Staubiges, muffiges Heu erhöht das Risiko für Pferde am EA zu erkranken (Couëtil et al., 2016; Ivester et al., 2018; Bullone & Lavoie, 2020). Außerdem können pathogene Bakterien der Gattung *Leptospira* durch Nagerurin kontaminiertes Futter auf Pferde übertragen werden (Verma et al., 2013; Malalana et al., 2015; Di Azevedo & Lilenbaum, 2022). Dies hat weitreichende Bedeutung, da die Erkrankung Leptospirose eine Zoonose darstellt und auch Menschen die mit diesen Tieren zusammenarbeiten, betroffen sein können (Verma et al., 2013; Malalana et al., 2015).

Die Auswertungen der Mineralstoffe zeigten Abnahmen durch die Bedampfung beim Mg (1,37 g/kg TM nativ; 1,31 g/kg TM bedampft; $p < 0,034$) und dem Ca (3,99 g/kg TM nativ; 3,66 g/kg TM bedampft; $p < 0,011$). An den freien Carboxygruppen der Pektinmoleküle sind Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen durch elektrostatische Wechselwirkungen für den Zusammenhalt der Pektinstränge verantwortlich (Tchetseubu Saha, 2010; Heldt & Piechulla, 2015). Diese bilden zusammen mit der Hemizellulose die Klebstoffe der Pflanzenzellwand (Heldt & Piechulla, 2015). Obwohl Pektin nicht zu den Hauptkohlenhydraten in Futtermitteln gehört, kann es 10 bis 20 % des gesamten Kohlenhydratkomplexes in Gräsern bzw. Luzerne ausmachen (Dehority, 1969). Es ist vorstellbar, dass durch die Hitzebehandlung die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Pektinsträngen gelöst und die Makromoleküle ausgespült werden können.

Ein Mg- Verlust nach der Bedampfung konnte von Blackman & Moore-Colyer (1998) ebenfalls festgestellt werden. In der Studie von Glatter et al. (2021) wurde ein Ca- Verlust nach der Wasserdampfbehandlung einer Heuprobe beobachtet. Da der Pektingehalt pflanzenabhängig ist, lässt sich auch die Schwankung in den Untersuchungsergebnissen erklären (Cheng et al., 1979).

In einigen Studien wurde infolge der Bedampfung eine Reduktion des Gehaltes an wasserlöslichen Kohlenhydraten (WLK) festgestellt. In der Untersuchung von Moore-Colyer et al. (2016) sank der Gehalt an WLK um 18 % und Earing et al. (2013) stellte eine Reduzierung von 12 % der WLK nach der Behandlung fest. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind unklar. In der vorliegenden Studie sank der Gehalt an WLK nicht (natives und bedampftes Heu \approx 113 g WLK/kg TM). Was die Ergebnisse der überwiegenden Anzahl, vorangegangener Studien zur Bedampfung von Heu, bestätigt (Blackman & Moore-Colyer, 1998; Owens et al., 2019; Glatter et al., 2021). Der Gehalt an WLK im Heu ist besonders abhängig von der Gräsersorte, dem Reifegrad bei der Ernte, der Tageszeit oder den Wetterbedingungen während der Ernte und der Lagerung (Moore-Colyer, 1996; Séguin et al., 2010; Owens et al., 2019). Vor allem für die Fütterung stoffwechselerkrankter Pferde wie z.B. einer gestörten Insulinsensitivität wird empfohlen, den Gehalt an WLK im Heu zu reduzieren. Im Ergebnis der vorliegenden Untersuchung und einer Auswertung der einschlägigen Literatur stellt die Bedampfung von Heu dafür keine geeignete Methode dar.

Im Gegensatz dazu kann die Bedampfung von Heu als Behandlungsform für Pferde, die am Equinen Asthma leiden genutzt werden. Es wurde in zahlreichen Untersuchungen bewiesen, dass allergieauslösende Faktoren wie lebensfähige Mikroorganismen, Staub und Bakterien durch die Bedampfung erfolgreich eliminiert werden können (Blackman & Moore-Colyer, 1998; Moore-Colyer et al., 2016; Glatter et al., 2021). Die Nährstoffgehalte wurden in diesen Studien ebenfalls untersucht und von einer Konservierung des XP gesprochen (Blackman & Moore-Colyer, 1998; Moore-Colyer et al., 2014, 2016). Bezogen auf den XP Gehalt konnte dies auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Doch innerhalb des XP gab es einen enormen Shift zu Lasten des löslichen

NDSXP. Der Anteil des unlöslichen NDIXP stieg durch die Bedampfung um 57 % an. In der vorliegenden Arbeit wird vermutet, dass sich der Anstieg des NDIXP unter anderem durch die Entstehung von MRP beschreiben lässt. Dazu wurden die MRP Furosin und CML im nativen und bedampften Heu untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich bereits im nativen Heu MRP nachweisen lassen (Furosin 17,6 mg/100g TM; CML 5,1 mg/100g TM). Was darauf schließen lässt, dass MRP schon bei der Trocknung auf dem Feld oder vielleicht sogar vorher in der Pflanze entstehen können. Dies ist durchaus vorstellbar, da aus der humanen Diabetesforschung bekannt ist, dass MRP bereits unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Organismus gebildet werden (Hellwig & Henle, 2014). Nichtsdestotrotz steigen durch die Bedampfung die MRP enorm an, Furosin steigt um 67 % (nativ 17,6 mg/100g TM; bedampft 29,4 mg/100g TM; $p < 0,001$) und CML sogar um 120 % (nativ 5,1 mg/100g TM; bedampft 11,3 mg/100g TM; $p < 0,001$). Die Abbildung 1 zeigt eine starke positive Korrelation beider Parameter mit dem unlöslichen Teil des Proteins NDIXP. Durch Summenbildung der MRP Furosin und CML kann der Anstieg des NDIXP mit einem Bestimmtheitsmaß der positiven linearen Regression von 83 % gezeigt werden. Ergo bedeutet der Anstieg der MRP ein Anstieg des unlöslichen Proteins und somit des für Pferde vermutlich praecaecal unverdaulichen Rohproteins. Da Furosin und CML die MRP eines reduzierenden Zuckers mit der Lysin-Seitenkette eines Proteins darstellen, wird nicht nur diese essentielle AS irreversibel geschädigt und steht dem Pferd zur praecaecalen Absorption und intermediären Verwertung nicht mehr zur Verfügung (Erbersdobler & Somoza, 2007; Hellwig & Henle, 2014), sondern auch das Muster an verfügbaren AS eines Proteins wird verändert. Durch die Vernetzung auch noch weiterer AS im Rahmen der MR (Förster, 2006) kann die Angreifbarkeit ganzer Proteine durch körpereigene Verdauungsenzyme herabgesetzt sein, was einen großen Teil der quantitativen Ausprägung der behandlungsbedingten Reduktion der pcV von XP zu erklären vermag.

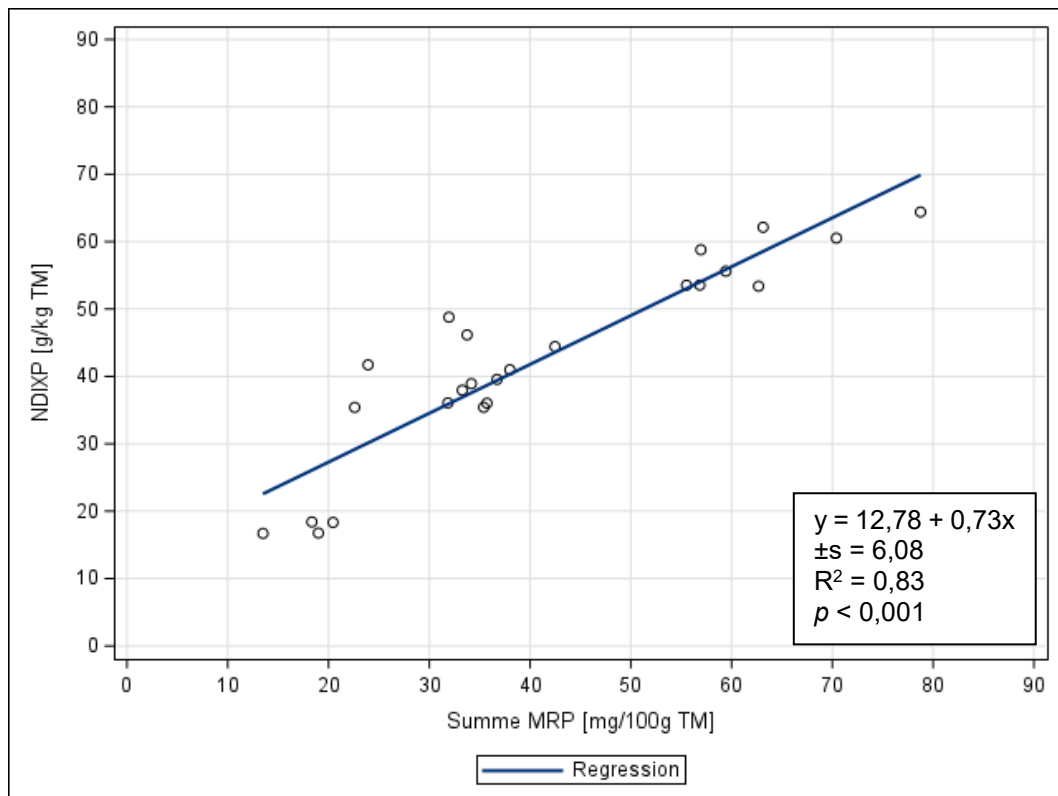


Abbildung 1. Lineare Abhängigkeit des Gehaltes an NDIXP von der Summe der MRP Furosin und CML im bedampften Heu

So betrug in der vorliegenden Untersuchung die pcV von XP im nativen Heu im Mittel 56 %, war jedoch nach der Bedampfung auf 35 % herabgesetzt. Bei der Messung der AS konnten beim Lys (nativ 3,3 g/kg TM; bedampft 2,5 g/kg TM; $p < 0,001$) und dem Arginin (Arg; nativ 3,5 g/kg TM; bedampft 3,2 g/kg TM; $p < 0,001$) die höchsten Differenzen durch die Bedampfung festgestellt werden. Es ist zu vermuten, dass durch die MR veränderte Lys- bzw. Arg- Seitenketten des Proteins bei der AS-Analyse nicht mehr als solche analysiert werden können. Dazu wurde eine Regressionsanalyse mit dem Lys und dem Maillard Produkt Furosin durchgeführt. Es kann eine positive Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von ca. 53 % gezeigt werden. So lässt sich der Verlust an Lys etwa zur Hälfte über die Entstehung von der ersten Stufe der MR, dem Furosin, erklären (Abbildung 2). Die hier untersuchten MRP zeigen nur zwei Beispiele für die Reaktion mit der AS Lys, es gibt noch weitere MR zu Lysin-Derivaten die hier nicht untersucht wurden oder sogar noch nicht bekannt sind (Hofmann, 2021). Auch darf die Entstehung von Protein- Quervernetzungen durch MR nicht außer Acht gelassen werden (Förster, 2006). Zumindest für die AS Lys lässt sich der

Verlust durch die Bedampfung auch quantitativ beschreiben. In der vorliegenden Untersuchung entstand ein behandlungsbedingter Gesamtverlust an Lys von 0,8 g/kg TM, wobei die Summe der gemessenen MRP 0,41 g/kg TM betrug. Dabei ist zu beachten, dass mit Furosin und CML nur eine Auswahl an MRP gemessen wurde, welche jedoch qualitativ eine gute Charakterisierung der Abnahme an verfügbarem Lysin und auch autoenzymatisch verdaubarem Protein zulässt. Die Abbildung 2 demonstriert die Notwendigkeit des Vorhandenseins der korrespondierenden AS für die MR sehr gut, denn wenn nur wenig der infrage kommenden AS im Futtermittel vorhanden ist, kann die MR nur in begrenztem Umfang ablaufen. Mit steigendem Lys-Gehalt steigt auch der Gehalt an Furosin. Das bedeutet im Umkehrschluss das, dass fürs Pferd essentielle pcvLys im Futtermittel abnimmt. Da das MRP für die Reaktion mit Arg nicht untersucht wurde, wurde hier das Arg mit dem NDIXP

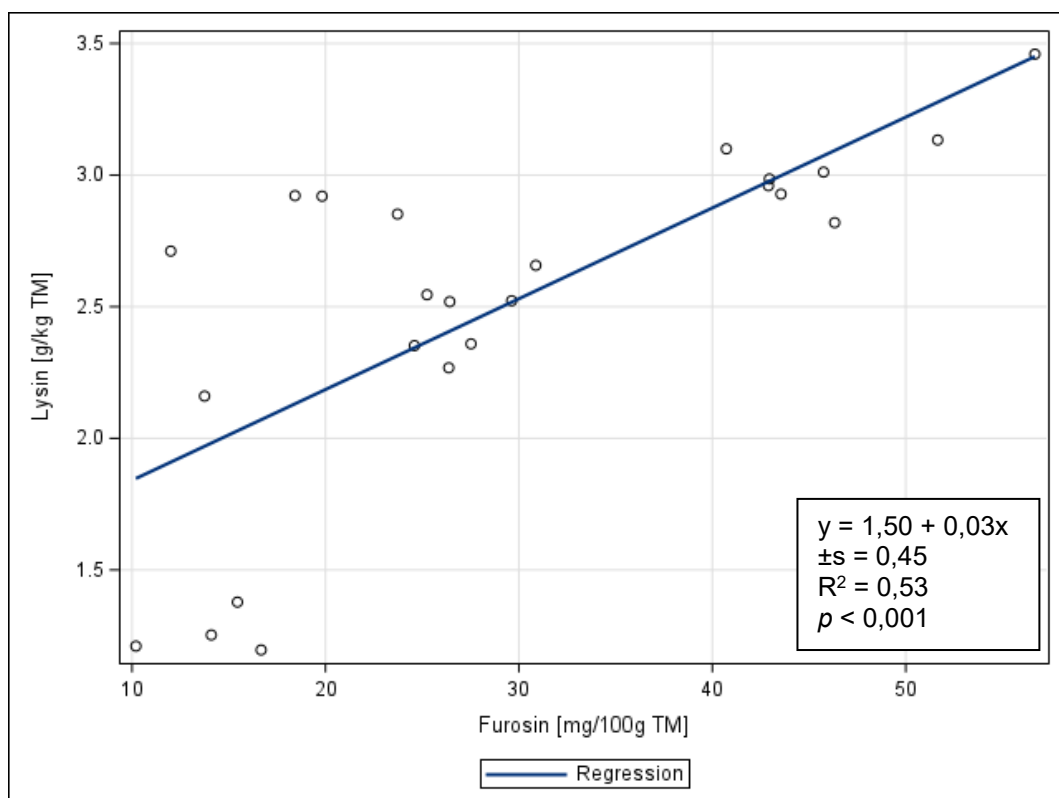


Abbildung 2. Lineare Abhängigkeit des Gehaltes an Lysin von dem MRP Furosin im bedampften Heu

vergleichend korreliert (Abbildung 3). Es wird vermutet, dass auch hier der höhere Anteil des Arginins durch MR in einen unlöslichen Teil verändert wird und somit der NDIXP Gehalt bei entsprechend hohem Arginin-Gehalt, ansteigt. Ergo wird auch hier das pcvArg abnehmen. Dass die Blockierung enzymatischer Spaltstellen von AS durch MR stattfinden kann steht außer Frage, jedoch bleibt es offen, ob sich die hier gezeigten Ergebnisse vollständig über die MR erklären lassen. Dies ist ein erster, erfolgsversprechender Ansatz um den hohen Anteil an unlöslichem Protein nach der Bedampfung zu beschreiben. Aufgrund Ihrer Polarität reagieren die beiden AS Lys und Arg am schnellsten mit einem reduzierenden Zucker und sind in der vorliegenden Untersuchung auch am stärksten betroffen. Dies spiegelt sich aber auch in den Ergebnissen der restlichen pcvEAS wieder. Hier konnte für alle EAS eine starke Reduktion nach der Bedampfung gezeigt werden. Im nativen Heu konnten noch folgende pcvEAS Gehalte gemessen werden: pcvLys 1,82 g/kg TM, pcvCys 0,40 g/kg TM, pcvMet 0,63 g/kg TM, pcvThr 1,65 g/kg TM. Die Gesellschaft

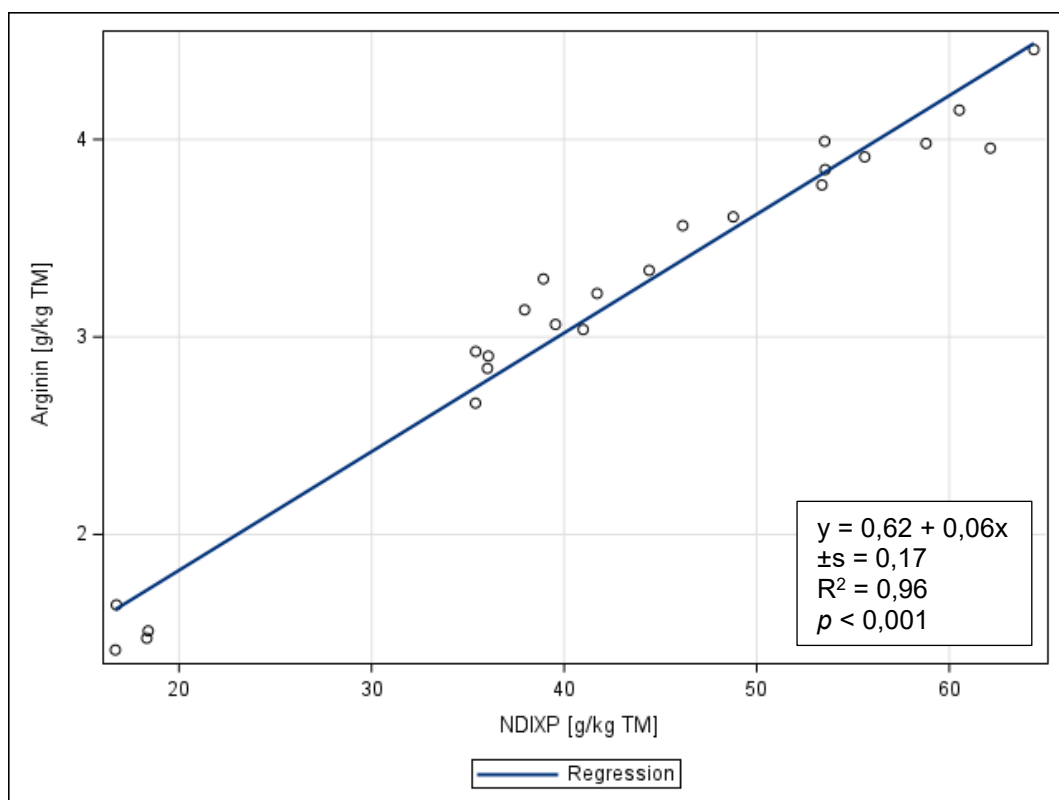


Abbildung 3. Lineare Abhängigkeit des Gehaltes an Arginin von dem unlöslichen Teil des Proteins NDIXP im bedampften Heu

für Ernährungsphysiologie (2014) gibt Empfehlungen für die tägliche Aufnahme von pcvEAS und dem pcvXP für Pferde heraus. Da sich der Anteil des NDIXP durch die Bedampfung so massiv erhöht, verändert sich entsprechend auch die pcvXP zum negativen (nativ 38 g/kg TM; bedampft 23 g/kg TM). Auf Grundlage der Bedarfsnormen der GfE lassen sich für ein 600 kg schweres Warmblut-Pferd der Bedarf ermitteln (Tabelle 1). Bezogen auf das native Heu bedeutet es, dass ein 600kg schweres Pferd im Schnitt rund 12 kg/d TM benötigt um seinen Bedarf an EAS ausschließlich über Heu zu decken. Eine drastische Änderung gibt es nun durch die Bedampfung. Die Werte für pcvEAS ändern sich wie folgt: pcvLys 0,84 g/kg TM, pcvCys 0,21 g/kg TM, pcvMet 0,36 g/kg TM, pcvThr 0,97 g/kg TM. Das bedeutet eine Erhöhung der Heu Menge von 8 kg/d TM um beispielsweise den Bedarf an pcvThr ausschließlich über Heu zu decken (Tabelle 1). Beim Lys wäre es eine Erhöhung auf 18 kg/d TM die durch bedampftes Heu zur Verfügung gestellt werden müsste (Tabelle 1).

Tabelle 1. Empfehlungen zur Versorgung von Pferden unter Erhaltungsbedingungen mit praecaecal verdaulichem Rohprotein und ausgewählten praecaecal verdaulichen, essentiellen Aminosäuren (GfE 2014) und dafür erforderliche Heumenge

	Versorgungsempfehlung		erforderliche Heumenge (in kg TM/Tag) ¹	
	(pro kg LM _{0,75} und Tag)	(in g/Tag) ²	natives Heu	bedampftes Heu
pcvXP	3 g	365	10	16
pcvLys	122 mg	15	8	18
pcvMet+Cys	76 mg	10	12	20
pcvThr	152 mg	19	10	18

¹ kalkuliert basierend auf den vorliegenden Versuchsergebnissen; ² für 600 kg LM; LM, Lebendmasse

Die Bereitstellung solcher Mengen von bedampftem Heu stellt einen enormen Arbeitsaufwand dar. Doch nicht nur der erhöhte Aufwand, auch die Menge an Heu die bereitgestellt werden müsste, übersteigt den Energiebedarf eines 600 kg schweren Pferdes im Erhaltungsbedarf enorm. Laut Bedarfsnormen der GfE (2014) beträgt der Energieerhaltungsbedarf

für ein 600 kg schweres Warmblut 63 MJ ME/kg ($0,52 \cdot 600 \text{kg}^{0,75}$). Dies bedeutet für das hier untersuchte Heu, dass der Energieerhaltungsbedarf mit 9 kg/d TM für natives und bedampftes Heu gedeckt wäre. Berechnet wurde das nach Kuchler et al. (2020) unter Berücksichtigung der renalen Verluste mit folgender Formel:

$$\text{ME mod. (MJ kg/TM)} = -3,865 + (0,0166 \cdot \text{XP}) + (0,0420 \cdot \text{XL}) - (0,0019 \cdot \text{XF}) + (0,0185 \cdot \text{NfE})$$

Um einerseits eine energetische Überversorgung und andererseits eine Unterversorgung an EAS zu verhindern, ist es empfehlenswert die Ration von Pferden denen ausschließlich bedampftes Heu gefüttert wird, über eine geeignete Aminosäure- bzw. Proteinquelle auszugleichen. Dies ist besonders im Hinblick auf Zuchtstuten, wachsende Tiere oder generell Pferde unter besonderer Beanspruchung zu berücksichtigen (Zeyner et al., 2015). Dazu zählen sicherlich auch Tiere die sich in Rekonvaleszenz befinden.

Eine weitere in dieser Arbeit untersuchte Methode ist die Quantifizierung des Pepsin-unlöslichen Rohproteins (puXP). Dieser Parameter spiegelt den Anteil an XP wieder, welcher durch Behandlung nach Salzsäure (HCl) und Pepsin nicht in Lösung geht. Er wird in der Futtermittelbewertung für Wiederkäuer genutzt und wird in % des XP angegeben (Mass et al., 1999). Das puXP wird u.a. ausgewiesen um Hitzeschäden durch Trocknungs-, Silier- oder Pelletierprozesse zu beschreiben (Kuhnitzsch, 2019). Es könnte also eine mögliche Alternative zu den apparativ aufwändigen Analysen der MRP darstellen. Dabei wird bei der Beurteilung von Futtermitteln das puXP allgemein in $\text{puXP} < 25\%$ des XP eingeteilt, welches keine Hitzeschädigung bedeutet und $\text{puXP} > 30\%$ des XP würde eine Hitzeschädigung des Futtermittels bedeuten (Steinhöfel, 2008). Abbildung 4 zeigt nun chargenweise die Untersuchungsergebnisse des vorliegenden Heus für puXP. Die Gehalte im nativen Heu sind bereits recht hoch. Dies bestätigt ebenfalls die Vermutung einer hitzebedingten Proteinschädigung auf dem Feld. Wenn das Heu so eingeteilt wird wie eingangs beschrieben, würde bereits das native Heu als hitzebeschädigt eingestuft werden (Abbildung 4). Die hier untersuchten Heuchargen liegen alle über den angegebenen 30 % puXP am XP, was die Einschätzung

erschwert.

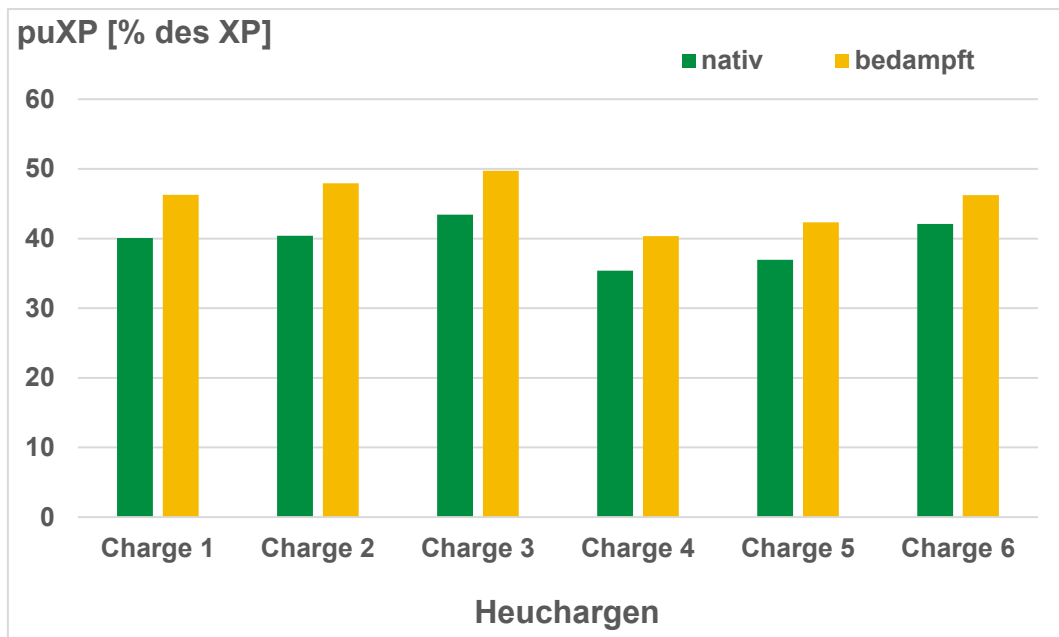


Abbildung 4. Pepsin-unlösliches Rohprotein (puXP) in % des XP je Heucharge

Die puXP-Gehalte im bedampften Heu liegen nur marginal über den Ergebnissen des nativen Heus. In der Abbildung 5 wurde das puXP als Marker für Hitzeschäden, mit dem NDIXP vergleichend korreliert. Es kann weder eine positive noch eine negative Korrelation festgestellt werden und das Bestimmtheitsmaß beträgt nach Regression 0,001. Somit scheint sich der Parameter als Indikator für thermische Proteinveränderungen im Heu nicht zu eignen. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse stellen die Beurteilung der Ergebnisse des puXP als kritisch für das hier untersuchte Futtermittel dar. Als Alternative für die Untersuchung der MRP eignet sich die Methode daher eher nicht. Durch die Analyse der MRP kann zudem gezeigt werden, welche AS durch die Reaktion maßgeblich betroffen sind. Die Ergänzung der Analyse von NDIXP durch puXP scheint zumindest für bedampftes Heu keinen zusätzlichen Informationsgewinn zu erbringen. Allerdings lag innerhalb der Parallelen jeder einzelnen Heucharge ein negativer Zusammenhang zwischen dem Gehalt an puXP und der pcV XP mit einer hohen Bestimmtheit des linearen Zusammenhanges von im Mittel 84 % vor (Pisch et al. 2022; Figure S4, Table S3). Dies bedeutet zumindest auf eine grundlegende Eignung von puXP als unabhängige Variable hin. Vorteile gegenüber des ohnehin zur Proteinbewertung für Pferde erfassten

Gehaltes an NDIXP sind hier allerdings nicht zu erkennen.

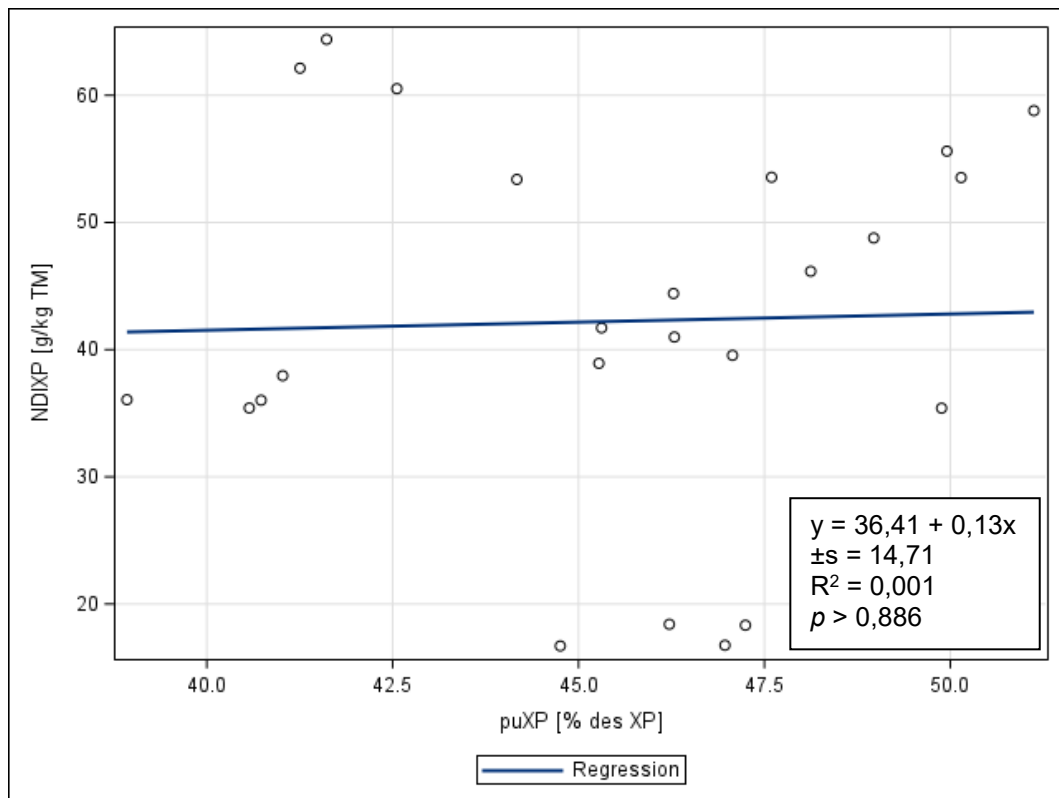


Abbildung 5. Lineare Abhängigkeit des Gehaltes von NDIXP an puXP

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Reduktion des praecaecal verdaulichen Anteils von Rohprotein und Aminosäuren durch die Bedampfung von Heu zu überprüfen. Vorliegende Literaturangaben zur Bedampfung von Heu wurden dafür vergleichend herangezogen. Untersucht wurden sechs verschiedene, regionale Heuchargen auf ihre nativen und nach der Bedampfung gemessene, chemische Zusammensetzung. Dabei wurde vor allem in lösliches und unlösliches Rohprotein fraktioniert. Hierbei wurde ein Shift innerhalb des Rohproteins zu Gunsten des unlöslichen Anteils nach der Bedampfung gezeigt. Die Erhöhung des unlöslichen und somit für Pferde vermutlich praecaecal unverdaulichen Anteiles des Rohprotein war mit 57 % um mehr als die Hälfte gestiegen. Entsprechend sank die praecaecale Verdaulichkeit des Rohprotein von im Mittel 56 % im nativen Heu auf nur noch 35 % im bedampften Heu. Dieser Effekt trat systematisch bei jedem Bedampfungsvorgang auf. Neben den hohen Temperaturen von bis zu 100 °C, entsteht auch Wasserdampf während des Prozesses. Diese Effekte sind einerseits, für die Abtötung von Mikroorganismen und Bindung der Staubpartikel essentiell, aber andererseits auch für den starken Anstieg des unlöslichen Rohproteins verantwortlich. Die dabei gemessene, massive Entstehung von Maillard Reaktionsprodukten durch die Hitzeeinwirkung scheint ein Grund für diesen Anstieg zu sein. Jedoch sind bereits im nativen Zustand vergleichsweise geringe Gehalte an Maillard Reaktionsprodukte messbar, wobei nicht klar ist, ob diese bereits in der Pflanze oder bei der Trocknung auf dem Feld entstehen. Die Konzentration an Maillard Reaktionsprodukten ist zeit- und temperaturabhängig und steigt von feuchten zu trockenen Behandlungsprozessen an (Förster, 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Maillard Reaktionsprodukte, Furosin und Carboxymethyllysin, sind indikativ für diese Reaktion, welche viele weitere Produkte mit unterschiedlichsten Aminosäuren hervorbringen kann. Die hier untersuchten Maillard Reaktionsprodukte stehen für die Reaktion aus einem reduzierenden Zucker und der für das Pferd essentiellen Aminosäure Lysin. Die Reduktion

des Gehaltes an praecaecal verdaulichem Lysin um 54 % im bedampften vs. nativen Heu ist für die Pferdefütterung (v.a. Zuchtstuten und intensiv wachsende Pferde) von praktischer Relevanz. Weitere praecaecal verdauliche essentielle Aminosäuren, wie das praecaecal verdauliche Threonin oder die praecaecal verdaulichen, schwefelhaltigen Aminosäure Cystin und Methionin wurden durch die Behandlung mit Wasserdampf im Mittel um über 40 % reduziert. Dabei kommt dem praecaecal verdaulichem Threonin eine besondere Bedeutung bei Pferden zu, welche im Erhaltungsstoffwechsel stehen oder nur eine vergleichsweise geringe körperliche Beanspruchung erfahren, also dem Freizeitpferd und damit dem Großteil der Pferdepopulation in Deutschland.

In der vorliegenden Arbeit kann die eingangs aufgestellte Hypothese, dass die bei der Bedampfung entstehenden hohen Temperatur zu einer Reduktion der praecaecale Verdaulichkeit von Rohprotein und Aminosäuren führt, bestätigt werden. Durch die Behandlung wird der Gehalt an dem praecaecal verdaulichem Anteil im Heu wesentlich reduziert. Dessen ungeachtet wurde in anderen Untersuchungen eine sehr hohe Effektivität des Bedampfens beim Abtöten von Mikroorganismen nachgewiesen (Moore-Colyer & Fillery, 2012; Moore-Colyer et al., 2016; Glatter et al., 2021). Daher ist die Methode der Heubedampfung für Pferde, die beispielsweise am equinen Asthma leiden, geeignet. Die Reduktion der essentiellen AS sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden. Wenn betroffene Pferde ausschließlich auf Basis von bedampftem Heu gefüttert werden, empfiehlt es sich die Ration mit hochwertigen Proteinzulagen oder Aminosäuren auszugleichen.

VI. SUMMARY

The objective of the present study was to examine a reduction of the praecaecal digestible content of crude protein and amino acids in steamed hay when compared to native hay. Six different regional hay batches were analysed for their different chemical content in native and steamed hay. The fractionation into soluble and insoluble crude protein was essential, and an increase in the insoluble fraction of crude protein was observed after steaming. The increase in the insoluble, and thus presumably praecaecally indigestible to horses, amount of crude protein increased by 57%. Correspondingly, the pre-caecal digestibility of crude protein decreased from an average of 56 % in native hay to only 35 % in steamed hay. This effect occurred systematically with each steaming process. In addition to the high temperatures of up to 100 °C, water steam is also generated during the process. These effects are, on the one hand, essential for the reduction of viable microorganisms and binding of dust particles, but on the other hand, also responsible for the strong increase in insoluble crude protein. The measured large formation of Maillard reaction products due to the heat treatment seems to be one reason for this increase. However, comparatively low contents of Maillard reaction products are already measurable in the native hay, although it isn't known whether these are formed in the living plant or during drying process in the field. The concentration of Maillard reaction products is time and temperature dependent and increases from moist to dry treatment processes (Förster, 2006).

The Maillard reaction products investigated in the present study, furosine and carboxymethyllysine, are indicative of this reaction, which can yield many other products with a wide variety of amino acids. The Maillard reaction products analysed represent the chemical reaction from a reducing sugar and the amino acid lysine, which is essential for the horse. The reduction of the content of praecaecal digestible lysine by 54 % in steamed vs. native hay is of practical relevance for horse nutrition (especially broodmares and intensively growing horses). Other praecaecal digestible essential amino acids, such as the praecaecal digestible threonine or the

praecaecal digestible, sulphur-containing amino acids cystine and methionine, were reduced by more than 40 % on average by treatment with steam. In this context, the precaecal digestible threonine is of particular importance for horses which are in maintenance metabolism or which experience only comparatively low exercise, i.e. the leisure horses and thus the majority of the horse population in Germany.

In the present study, it can be confirmed that the high temperature generated during steaming leads to a reduction of the precaecal digestibility of crude protein and amino acids. The treatment significantly reduces the content of the praecaecal digestible fraction in the hay. Nevertheless, other research has demonstrated very high effectiveness of steaming in eliminating microorganisms or binding dust particles (Moore-Colyer & Fillery, 2012; Moore-Colyer et al., 2016; Glatter et al., 2021). Therefore, the method of hay steaming is appropriate for horses suffering from respiratory diseases. However, the reduction of essential AS should not be ignored. If diseased horses are fed only steamed hay, it is recommended to balance the ration with high-quality protein supplements or amino acids.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Blackman, M., Moore-Colyer, M. J. S. (1998). Hay for horses: The effects of three different wetting treatments on dust and nutrient content. *Animal Science*, 66(3), 745–750. <https://doi.org/10.1017/S1357729800009334>

Bullone, M., Lavoie, J.-P. (2020). The equine asthma model of airway remodeling: From a veterinary to a human perspective. *Cell and Tissue Research*, 380(2), 223–236. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03117-4>

Cheng, K.-J., Dinsdale, D., Stewart, C. S. (1979). Maceration of clover and grass leaves by *Lachnospira multiparus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(4), 723–729. <https://doi.org/10.1128/aem.38.4.723-729.1979>

Couëtil, L. I., Cardwell, J. m., Gerber, V., Lavoie, J.-P., Léguillette, R., Richard, E. a. (2016). Inflammatory Airway Disease of Horses—Revised Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(2), 503–515. <https://doi.org/10.1111/jvim.13824>

Dauvillier, J., Woort, F., van Erck-Westergren, E. (2019). Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 968–975. <https://doi.org/10.1111/jvim.15397>

Dehority, B. A. (1969). Pectin-fermenting bacteria isolated from the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, 99(1), 189–196. <https://doi.org/10.1128/jb.99.1.189-196.1969>

Di Azevedo, M. I. N., Lilenbaum, W. (2022). Equine genital leptospirosis: Evidence of an important silent chronic reproductive syndrome. *Theriogenology*, 192, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.029>

Earing, J. E., Hathaway, M. R., Sheaffer, C. C., Hetchler, B. P., Jacobson, L. D., Paulson, J. C. Martinson, K. L. (2013). Effect of hay steaming on forage nutritive values and dry matter intake by horses¹. *Journal of Animal Science*, 91(12), 5813–5820. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6333>

Erbersdobler, H. F. Somoza, V. (2007). Forty years of furosine – Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(4), 423–430. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600154>

Erbersdobler, H., Gunsser, I. Weber, G. (1970). Abbau von Fruktoselysin durch die Darmflora. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe A*, 17(6), 573–575. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1970.tb00811.x>

Förster, A. (2006). Quantitative Studien zu vorkommen und metabolischem Transit alimentärer Maillard-reaktions-produkte. Dissertation, Technische Universität Dresden, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Dresden.

Fox, D. G., Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Russell, J. B. Van Soest, P. J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. *Journal of Animal Science*, 70(11), 3578–3596. <https://doi.org/10.2527/1992.70113578x>

Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden. In *Energie- und Nährstoffbedarf Landwirtschaftlicher Nutztiere*; DLG-Verlag: Frankfurt, Germany, 2014; Volume 11.

Gibbs, P. G., Potter, G. D., Schelling, G. T., Kreider, J. L. Boyd, C. L. (1988). Digestion of hay protein in different segments of the equine digestive tract. *Journal of Animal Science*, 66(2), 400–406. <https://doi.org/10.2527/jas1988.662400x>

Gibbs, P. G., Potter, G. D., Schelling, G. T., Kreider, J. L., Boyd, C. L. (1996). The significance of small vs large intestinal digestion of cereal grain and oilseed protein in the equine. *Journal of Equine Veterinary Science*, 16(2), 60–65. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(96\)80157-2](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(96)80157-2)

Glatter, M., Bochnia, M., Wensch-Dorendorf, M., Greef, J. M., Zeyner, A. (2021). Feed Intake Parameters of Horses Fed Soaked or Steamed Hay and Hygienic Quality of Hay Stored following Treatment. *Animals*, 11(9), 2729. <https://doi.org/10.3390/ani11092729>

Haley, R. G., Potter, G. D., Lichtenwalner, R. E. (1979). Digestion of

soybean and cottonseed protein in the equine small intestine. Proc 6th Equine Nutrition Physiology Symp, 85–98.

Heldt, H. W., Piechulla, B. (2015). Pflanzenbiochemie. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44398-9>

Hellwig, M., Auerbach, C., Müller, N., Samuel, P., Kammann, S., Beer, F., Gunzer, F., Henle, T. (2019). Metabolization of the Advanced Glycation End Product N^ε-Carboxymethyllysine (CML) by Different Probiotic E. coli Strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(7), 1963–1972. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06748>

Hellwig, M., Bunzel, D., Huch, M., Franz, C. M. A. P., Kulling, S. E., Henle, T. (2015). Stability of Individual Maillard Reaction Products in the Presence of the Human Colonic Microbiota. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(30), 6723–6730. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01391>

Hellwig, M., Henle, T. (2014). Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. Angewandte Chemie International Edition, 53(39), 10316–10329. <https://doi.org/10.1002/anie.201308808>

Hintz, H. F., Hogue, D. E., Walker Jr, E. F., Lowe, J. E., Schryver, H. F. (1971). Apparent digestion in various segments of the digestive tract of ponies fed diets with varying roughage-grain ratios. Journal of Animal Science, 32(2), 245–248. <https://doi.org/10.2527/jas1971.322245x>

Hodge, J. E. (1953). Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1(15), 928–943.

Hofmann, T. (2021). Freie Maillard-Reaktionsprodukte in tierischen Lebensmitteln als Marker für eine artgerechte Tierfütterung. Dissertation, Technische Universität Dresden, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Dresden.

Ivester, K. M., Couëtil, L. L., Moore, G. E. (2018). An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. Journal of Veterinary Internal Medicine, 32(5), 1754–1762. <https://doi.org/10.1111/jvim.15226>

Jolliffe, N. A., Craddock, C. P., Frigerio, L. (2005). Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochemical Society Transactions*, 33(5), 1016–1018. <https://doi.org/10.1042/BST0331016>

Kamphues, J. (2013). Feed hygiene and related disorders in horses. *Equine Applied and Clinical Nutrition* (Ed. RJ Geor, PA Harris and M Coenen), 367–380.

Kamphues, J., Meyer, H. (Eds.). (2014). *Supplemente zur Tierernährung: Für Studium und Praxis* (12., überarb. Aufl). Schaper.

Klendshoj, C., Potter, G. D., Lichtenwalner, R. E., Householder, D. D. (1979). Nitrogen digestion in the small intestine of horses fed crimped or micronized sorghum grain or oats. *Proc 6th Equine Nutrition Physiology Symp*, 91–94.

Krishnamoorthy, U., Muscato, T. V., Sniffen, C. J., Van Soest, P. J. (1982). Nitrogen fractions in selected feedstuffs. *Journal of Dairy Science*, 65(2), 217–225. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82180-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82180-2)

Krishnamoorthy, U., Sniffen, C. J., Stern, M. D., Van Soest, P. J. (1983). Evaluation of a mathematical model of rumen digestion and an in vitro simulation of rumen proteolysis to estimate the rumen-undegraded nitrogen content of feedstuffs. *British Journal of Nutrition*, 50(3), 555–568. <https://doi.org/10.1079/BJN19830127>

Krull, H.-D. (1984). *Untersuchungen über Aufnahme und Verdaulichkeit von Grünfutter beim Pferd*. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Kuchler, M., Zeyner, A., Susenbeth, A., Kienzle, E. (2020). The effect of crude protein content of the diet on renal energy losses in horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(5), 1494–1500. <https://doi.org/10.1111/jpn.13377>

Kuhnitzsch C., Hofmann T., Bachmann M., Martens S., Henle T., Zeyner A., Steinhöfel O. (2019): Effekte des Silierens und Toastens teigreif geernteter Erbsen auf die Bildung von Maillard-Produkten. 15. Tagung Schweine- und Geflügelernährung (Tagungsband). Lutherstadt Wittenberg: 19.-21. November 2019, 149-151 (ISBN 978-3-96670-009-2)

Lanzas, C., Tedeschi, L. O., Seo, S., Fox, D. G. (2007). Evaluation of Protein Fractionation Systems Used in Formulating Rations for Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 507–521. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72653-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72653-X)

Licitra, G., Hernandez, T. M., Van Soest, P. J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 57(4), 347–358. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00837-3](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00837-3)

Malalana, F., Stylianides, A., McGowan, C. (2015). Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives. *The Veterinary Journal*, 206(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.017>

Mass, R. A., Lardy, G. P., Grant, R. J., Klopfenstein, T. J. (1999). In situ neutral detergent insoluble nitrogen as a method for measuring forage protein degradability. *Journal of Animal Science*, 77(6), 1565. <https://doi.org/10.2527/1999.7761565x>

Mazan, M. R. (2015). Update on Noninfectious Inflammatory Diseases of the Lower Airway. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 31(1), 159–185. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.008>

Moore-Colyer, M. J. S. (1996). Effects of soaking hay fodder for horses on dust and mineral content. *Animal Science*, 63(2), 337–342. <https://doi.org/10.1017/S1357729800014892>

Moore-Colyer, M. J. S., Fillery, B. G. (2012). The effect of three different treatments on the respirable particle content, total viable count and mould concentrations in hay for horses. In *Forages and grazing in horse nutrition* (pp. 101–106). Springer. DOI: 10.3920/978-90-8686-755-4_9

Moore-Colyer, M. J. S., Lumbis, K., Longland, A., Harris, P. (2014). The Effect of Five Different Wetting Treatments on the Nutrient Content and Microbial Concentration in Hay for Horses. *PLoS ONE*, 9(11), e114079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114079>

Moore-Colyer, M. J. S., Taylor, J. L. E., James, R. (2016). The Effect of Steaming and Soaking on the Respirable Particle, Bacteria, Mould, and Nutrient Content in Hay for Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*,

39, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.09.006>

O'Connor, J. D., Sniffen, C. J., Fox, D. G., Chalupa, W. (1993). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. *Journal of Animal Science*, 71(5), 1298–1311. <https://doi.org/10.2527/1993.7151298x>

Oste, R. E., Dahlqvist, A., Sjoestroem, H., Noren, O., Miller, R. (1986). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vitro studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(2), 355–358. <https://doi.org/10.1021/jf00068a051>

Owens, T. G., Barnes, M., Gargano, V. M., Julien, L., Mansilla, W. D., Devries, T. J., McBride, B. W., Merkies, K., Shoveller, A. K. (2019). Nutrient content changes from steaming or soaking timothy-alfalfa hay: Effects on feed preferences and acute glycemic response in Standardbred racehorses¹. *Journal of Animal Science*, 97(10), 4199–4207. <https://doi.org/10.1093/jas/skz252>

Rebolé, A., Treviño, J., Caballero, R., Alzueta, C. (2001). Effect of maturity on the amino acid profiles of total and nitrogen fractions in common vetch forage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(4), 455–461. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200103\)81:4<455::AID-JSFA834>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200103)81:4<455::AID-JSFA834>3.0.CO;2-V)

Reitnour, C. M., Baker, J. P., Mitchell Jr, G. E., Little, C. O. (1969). Nitrogen digestion in different segments of the equine digestive tract. *Journal of Animal Science*, 29(2), 332–334. <https://doi.org/10.2527/jas1969.292332x>

Routschek, A., Schmidt, J., Kreienkamp, F. (2014). Impact of climate change on soil erosion—A high-resolution projection on catchment scale until 2100 in Saxony/Germany. *CATENA*, 121, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.04.019>

Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., Sniffen, C. J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*, 70(11), 3551–3561. <https://doi.org/10.2527/1992.70113551x>

Schubert, R. (1997). Untersuchungen zum Stickstoff-und Aminosäuren-

Stoffwechsel laktierender Ponystuten nach oralen Gaben von 15N-Harnstoff. Einführung, Methode, 15N-Bilanz und Kinetik der 15N-Abgabe mit Kot, Harn und Milch. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 78(1-5), 196–211. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1997.tb00871.x>

Schmidt - Wetterau (1972), Silageherstellung, VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin

Séguin, V., Lemauviel-Lavenant, S., Garon, D., Bouchart, V., Gallard, Y., Blanchet, B., Diquelou, S., Personeni, E., Gauduchon, P., Ourry, A. (2010). Effect of agricultural and environmental factors on the hay characteristics involved in equine respiratory disease. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 135(3), 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.09.012>

Seidowski, A. (2010). Enzymatischer Abbau von Amadori-Produkten durch intestinale Disaccharidasen und intrazelluläre Ketosaminkinasen. Dissertation, Technische Universität Dresden, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Dresden.

Sharif, H. R., Williams, P. A., Sharif, M. K., Abbas, S., Majeed, H., Masamba, K. G., Safdar, W., Zhong, F. (2018). Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants – A review. *Food Hydrocolloids*, 76, 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.002>

Shewry, P. R., Casey, R. (1999). Seed Proteins. In P. R. Shewry & R. Casey (Eds.), *Seed Proteins* (pp. 1–10). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4431-5_1

Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G., Russell, J. B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70(11), 3562–3577. <https://doi.org/10.2527/1992.70113562x>

Steinhöfel, O. (2008). Untersuchung und Bewertung von Futtermitteln für Wiederkäuer: Eine gemeinsame Empfehlung des Landesarbeitskreises "Futter und Fütterung im Freistaat Sachsen". Sächsische Landesanst. für Landwirtschaft.

Tchetseubu Saha, G. (2010). Chemische Charakterisierung von Klason-

Ligninen aus unlöslichen Ballstoffen. Dissertation, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Hamburg.

Tedeschi, L. O., Pell, A. N., Fox, D. G., Llamas, C. R. (2001). The amino acid profiles of the whole plant and of four plant residues from temperate and tropical forages. *Journal of Animal Science*, 79(2), 525–532. <https://doi.org/10.2527/2001.792525x>

Tylutki, T. P., Fox, D. G., Durbal, V. M., Tedeschi, L. O., Russell, J. B., Van Amburgh, M. E., Overton, T. R., Chase, L. E., Pell, A. N. (2008). Cornell Net Carbohydrate and Protein System: A model for precision feeding of dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 143(1), 174–202. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.010>

Van Amburgh, M. E., Collao-Saenz, E. A., Higgs, R. J., Ross, D. A., Recktenwald, E. B., Raffrenato, E., Chase, L. E., Overton, T. R., Mills, J. K., Foskolos, A. (2015). The Cornell Net Carbohydrate and Protein System: Updates to the model and evaluation of version 6.5. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 6361–6380. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9378>

Van Amburgh, M. E., Foskolos, A., Collao-Saenz, E. A., Higgs, R. J., Ross, D. A. (2013). Updating the CNCPS feed library with new feed amino acid profiles and efficiencies of use: Evaluation of model predictions-version 6.5. 75th Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, October 2013, 59.

van Soest, P. J., Mason, V. C. (1991). The influence of the Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 32(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(91\)90008-G](https://doi.org/10.1016/0377-8401(91)90008-G)

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>

VDLUFA (2012). Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 3rd ed. Darmstadt, Germany

VDLUFA (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), Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.

Verma, A., Stevenson, B., Adler, B. (2013). Leptospirosis in horses. *Veterinary Microbiology*, 167(1), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.012>

Vitale, A., Hinz, G. (2005). Sorting of proteins to storage vacuoles: How many mechanisms? *Trends in Plant Science*, 10(7), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.05.001>

Wiame, E., Delpierre, G., Collard, F., Van Schaftingen, E. (2002). Identification of a Pathway for the Utilization of the Amadori Product Fructoselysine in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42523–42529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200863200>

Zeyner A., Grünewald K.-H., Esser S., Südekum K.-H. (2018): Contents of precaecally digestible crude protein and amino acids and the amino acid profile of the total and insoluble crude protein fraction of compound feeds for horses. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 27, 146.

Zeyner, A., Kirchhof, S., Susenbeth, A., Südekum, K.-H., Kienzle, E. (2015). A new protein evaluation system for horse feed from literature data*. *Journal of Nutritional Science*, 4. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.66>

Zeyner A., Meyer R., Steinhöfel O., Greef J.-M., Liebert F. (2020): Nutritive value of haylages for horses with special emphasis on praecaecally digestible crude protein and amino acids as well as on water-soluble carbohydrates. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 29, 42.

VIII. DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Zeyner für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation bedanken. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin wünschen können. Sie stand mir fachlich als auch organisatorisch jederzeit zur Seite und ließ mich zu keinem Zeitpunkt im Stich. Herzlichen Dank liebe Frau Zeyner.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Kienzle für die Überlassung des Themas und das Vertrauen zum Anfertigen der Dissertation als externe Doktorandin bedanken.

Auch für die Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Lischer möchte ich mich gerne bedanken. Er hat mich motiviert diesen Weg zu gehen und steht mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite.

Im Institut für Tierernährung der MLU Halle hatte ich das Glück mit Menschen zusammenarbeiten zu dürfen, die mir nicht nur auf kollegialer Ebene, sondern auch menschlich sehr ans Herz gewachsen sind. Besonders Frau Schmiedel hat mich jederzeit unterstützt, sei es bei der Laborarbeit oder anderen Aufgaben die im Institut angefallen sind. Sie hatte auf die ein oder andere Weise auch immer einen Scherz dabei. Es war eine wirklich schöne Zeit in der Theodor-Lieser-Str. welche fachübergreifend sehr bereichernd war. Vielen Dank an all meine lieben Kollegen die mich, und somit auch diese Arbeit so engagiert unterstützt haben.

Mein Dank gilt auch all denjenigen die mich auf diesem Weg begleitet und bestärkt haben. Dazu zählt natürlich meine Familie, Freunde und Kollegen. Danke Mutti, dass du meine größte Unterstützerin bist und Dich um meine Pferde kümmerst, wenn ich es mal nicht kann.