

Aus dem Institut für Tierernährung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Der Einfluss phytogener Futterzusatzstoffe auf die Nährstoffverdaulichkeit und
Aktivität verschiedener intestinaler Enzyme sowie Expression von
Nährstofftransportern bei Absetzferkeln**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Carolin Krämer
Tierärztin
aus Koblenz

Berlin 2013
Journal-Nr.: 3673

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Handler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Piglets, feed additives, fenugreek, Escherichia coli, polyphenols, flow cytometry,
adhesion, digestibility

Tag der Promotion: 27.02.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-444-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern und Anne

I INHALTSVERZEICHNIS

II TABELLENVERZEICHNIS

III ABBILDUNGSVERZEICHNIS

IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.2.	Polyphenole.....	2
2.2.1.	Herkunft	2
2.2.2.	Wirkungen.....	5
2.2.2.2.	Antimikrobielle Effekte.....	7
2.2.2.3.	Effekte der Polyphenole auf Verdauungsenzyme und Nährstoffaufnahme	8
2.2.3.	Polyphenole aus Äpfeln.....	13
2.2.4.	Quercetin	14
2.2.5.	Polyphenole in der Tierernährung.....	15
2.3.	Bockshornklee	18
2.3.1.	Zusammensetzung des Bockshornkleesamens.....	18
2.3.2.	Hypoglykämische, antidiabetogene Effekte und Wirkungen auf den Verdauungstrakt.....	19
2.3.3.	Weitere Wirkungen.....	23
2.4.	Ziel der Arbeit.....	24
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	25
3.1.	<i>In vitro</i>-Versuche	25
3.1.1.	Testmaterialien	25
3.1.2.	Versuchszelllinie.....	26

Inhaltsverzeichnis

3.1.3.	Bakterienstamm	28
3.1.4.	Versuchsablauf.....	28
3.1.5.	Durchflusszytometrie.....	30
3.2.	Fütterungsversuch.....	32
3.2.1.	Versuchstiere	32
3.2.2.	Versuchsfutter und Fütterung	32
3.2.3.	Leistungsparameter	34
3.2.4.	Probengewinnung	34
3.2.5.	Futtermittelanalyse	35
3.2.5.1.	Rohnährstoffe	35
3.2.5.2.	Mineralstoffe und Spurenelemente.....	36
3.2.5.3.	Bestimmung des α -Tocopherol-Gehalts.....	37
3.2.5.4.	Bestimmung der Aminosäuren	37
3.2.6.	Biochemische Methoden	40
3.2.6.1.	Isolierung der Bürstensaummembran.....	40
3.2.6.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	41
3.2.6.3.	Bestimmung der Aktivitäten verschiedener intestinaler Enzyme	41
3.2.6.5	Verdauungsphysiologische Untersuchungen.....	44
3.2.6.6.	Elektrophysiologische Untersuchungen des Jejunumgewebes mittels der UssingKammer.....	45
3.2.7	Molekularbiologische Untersuchungen.....	46
3.2.7.1.	Bestimmung der Genexpression ausgewählter intestinaler Enzyme.....	46
3.2.7.2.	Probenaufbereitung.....	47
3.2.7.3.	RNA-Extraktion	47
3.2.7.4.	Bestimmung des RNA-Gehalts und der RNA-Qualität.....	47

Inhaltsverzeichnis

3.2.7.5.	Reverse Transkription	47
3.2.7.6	Amplifikation der cDNA	47
3.2.7.7.	Auswertung der PCR.....	50
3.3.	Statistische Auswertungen.....	51
4.	ERGEBNISSE.....	52
4.1.	<i>In vitro</i>-Untersuchungen.....	52
4.2.	<i>In vivo</i>-Versuche.....	53
4.2.1.	Versuchsdiäten.....	53
4.2.2.	Zootechnische Leistungen	54
4.2.2.1.	Gesundheitszustand	54
4.2.2.2.	Lebendmasse und Lebendmassezunahme	55
4.2.2.3.	Futteraufnahme und Futteraufwand	56
4.2.3	Verdauungsphysiologische Parameter	57
4.2.3.1	Scheinbare Gesamtverdaulichkeit.....	57
4.2.3.2.	Praecaecale Verdaulichkeit.....	58
4.2.3.3.	pH - Werte in Urin, Digesta und Kot	59
4.2.4.	Biochemische Parameter	60
4.2.4.1.	Aktivitäten verschiedener intestinaler Enzyme	60
4.2.4.2.	Antioxidative Aktivität im Plasma	62
4.2.5.	<i>In vitro</i> -Untersuchungen von Darmgewebe der unterschiedlich gefütterten Ferkel mittels der Ussingkammer	62
4.2.6	Bestimmung der Genexpression ausgewählter intestinaler Enzyme.....	64
5.	DISKUSSION.....	66
5.1.	Hintergrund und Ziel der Arbeit	66
5.2.	<i>In vitro</i>-Untersuchungen.....	66

Inhaltsverzeichnis

5.2.1.	Kritik der Methode	67
5.2.2.	Einfluss der Testsubstanzen	67
5.3.	Fütterungsversuch	69
5.3.1.	Versuchsbedingungen	69
5.3.2.	Zootechnische Parameter	69
5.3.3.	Verdauungsphysiologische Parameter	71
5.3.3.1.	Scheinbare Gesamtverdaulichkeit	71
5.3.3.2.	Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit	72
5.3.4.	Biochemische Parameter	73
5.3.4.1.	Aktivität verschiedener intestinaler Enzyme	73
5.3.4.2.	Antioxidative Kapazität	74
5.3.5.	Elektrophysiologische Untersuchungen in der Ussingkammer	75
5.3.6.	Molekularbiologische Parameter	76
5.4.	Schlussfolgerung	77
6.	ZUSAMMENFASSUNG	78
7.	SUMMARY	80
	LITERATURVERZEICHNIS	82
	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	95
	DANKSAGUNG	96
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	97

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 2.1: Einteilung der Polyphenole, wichtigste Vertreter, Vorkommen und Gehalt in Lebens- und Futtermitteln	3
Tabelle 2.2: Polyphenolgehalte in Futterpflanzen (mg/100 g TS) (Bravo 1998)	4
Tabelle 2.3: Antioxidative Aktivität verschiedener Flavonoide in Relation zu Trolox (Vitamin E-Äquivalent) (Pietta 2000)	7
Tabelle 2.4: Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen Polyphenolgehalten und der resultierenden Enzymhemmung aus <i>in vitro</i> -Studien	10
Tabelle 2.5: Nachgewiesene Wirkungen von Flavonoiden.....	12
Tabelle 2.6: Polyphenolgehalte von Äpfeln in mg/100 g uS (Vrhovsek et al. 2004).....	13
Tabelle 2.7: Quercetiningehalt in Äpfeln (Neveu et al. 2010).....	15
Tabelle 2.8: Wirkungen des Quercetins	15
Tabelle 2.9: Inhaltsstoffe von Bockshornkleesamen (Basu und Srichamroen 2010).....	18
Tabelle 2.10: Wirkungen der aktiven Komponenten aus Bockshornkleesamen	19
Tabelle 2.11: Wirkung von Bockshornklee auf die Aktivität verschiedener Verdauungsenzyme von Ratten	22
Tabelle 3.1: Substanzen, die in den <i>in vitro</i> -Versuchen eingesetzt wurden.....	25
Tabelle 3.2: Verdünnungsschema der Testsubstanzen Fresta F [®] , Bockshornkleesamen und Pektin.....	26
Tabelle 3.3: Getestete Konzentrationen der Apfelextrakte, des Sulforaphans und des Glucoraphanins.....	26
Tabelle 3.4: Pipettierschema der mit Testsubstanzen behandelten IPEC-J2-Zellen auf einer 24er-Zellkulturplatte	28
Tabelle 3.5: Pipettierschema der mit Testsubstanzen behandelten IPEC-J2-Zellen auf einer 24er-Zellkulturplatte für die Infektion mit <i>E. coli</i>	30
Tabelle 3.6: Eingesetzte Chemikalien und Geräte für die <i>in vitro</i> -Untersuchungen.....	31
Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Ferkeldiäten	33
Tabelle 3.8: Eingesetzte Geräte und Chemikalien bei der Futtermitteluntersuchung	39
Tabelle 3.9: Bei den biochemischen Analysen eingesetzte Chemikalien und Geräte	43
Tabelle 3.10: Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (Osmolarität = 300 mosm/l, pH = 7,4).....	45
Tabelle 3.11: Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen (Ussingkammer) eingesetzte Chemikalien	46
Tabelle 3.12: In der qRT-PCR verwendete Primer.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.13: Bei den molekularbiologischen Untersuchungen eingesetzte Chemikalien, Geräte sowie die eingesetzte Software	50
Tabelle 4.1: Einfluss der phytoenen Substanzen auf die Adhäsion zwischen einem enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> - Stamm und IPEC-J2-Zellen ausgedrückt als relativer Anteil der fluoreszierenden Zellen (Mittelwerte und Standardabweichung, n = 5)	53
Tabelle 4.2: Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Spurenelementgehalt der vier Versuchsdiäten (Mittelwerte)	54
Tabelle 4.3: Mittlere Lebendmasse der Versuchsferkel der vier Versuchsgruppen bei Einnistung und in den einzelnen Versuchswochen in kg (Mittelwert und Standardabweichung)	55
Tabelle 4.4: Mittlere Lebendmassezunahme der Versuchsferkel der vier Versuchsgruppen in den einzelnen Versuchswochen sowie während des gesamten Versuchszeitraums in kg (Mittelwert und Standardabweichung)	55
Tabelle 4.5: Mittlere tägliche Futtermittelaufnahme pro Ferkel in kg errechnet für jedes Ferkel pro Flatdeck (Mittelwert und Standardabweichung)	56
Tabelle 4.6: Futtermittelaufwand der vier Versuchsgruppen während der vier Versuchswochen (Mittelwert und Standardabweichung)	56
Tabelle 4.7: Scheinbare Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins und der Aminosäuren in % (Mittelwert und Standardabweichung)	58
Tabelle 4.8: Praecaecale Verdaulichkeit des Rohproteins und der Aminosäuren (Mittelwert und Standardabweichung)	59
Tabelle 4.9: Mittlere pH-Werte von Digesta, Urin und Kot der Absetzferkel der 4 Fütterungsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung)	60
Tabelle 4.10: Aktivität (in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Protein) der alkalischen Phosphatase, L-Amino-peptidase N, Laktase, Maltase und Saccharase aus der Bürstensaummembran des Jejunums der Versuchsferkel der 4 Fütterungsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung, n = 12)	61
Tabelle 4.11: Antioxidative Kapazität im Blutplasma bestimmt durch das FRAP-Tests in $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{l}$ und das TEAC-Tests in $\mu\text{mol Trolox}/\text{l}$ (Mittelwert und Standardabweichung, n = 12)	62
Tabelle 4.12: Basalwerte des Kurzschlussstroms I_{sc} in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ der vier Versuchsgruppen (Mittelwert \pm Standardabweichung)	62
Tabelle 4.13: Relative Expression der Zielgene der drei Fütterungsgruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 4.1: Kurzschlussstrom ΔI_{sc} in $\mu A/cm^2$ der vier Fütterungsgruppen 3 min nach Zugabe von Glukose (10 mmol/l).....	63
Abbildung 4.2: Kurzschlussstrom ΔI_{sc} in $\mu A/cm^2$ der vier Fütterungsgruppen nach Zugabe von Phlorizin (100 $\mu mol/l$).....	63
Abbildung 4.3: Kurzschlussstrom ΔI_{sc} in $\mu A/cm^2$ der vier Fütterungsgruppen nach Zugabe von Carbachol (100 $\mu mol/l$)	64

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis:

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AK	Antikörper
APN	Aminopeptidase N
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
BD	Becton Dickinson
c	Konzentration
Caco-2	Human colonic adenocarcinoma cells
CFDA-Se	Carboxyfluorescein-Diazetat-N-Succinimidyl-Ester
d	Schichtdicke
DL	Deutsche Landrasse
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPEC	Enteropathogener <i>Escherichia coli</i>
FA	Futtermittelaufnahme
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAW	Futtermittelaufwand
FE	Futtermittelaufwaage
FI	Fluoreszenzintensität
FM	Futtermittel
FR	Futtermittelrest
FRAP	Ferric reducing ability of plasma
FSC	Forward Light Scatter
FV	Futtermittelverlust
Hep-2	Humane Epithelzelllinie 2
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEC-J2	Intestinal Porcine Epithelial Cell Line-Jejunal
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
LDL	low density lipoprotein
LM	Lebendmasse
LSD	kleinster signifikanter Unterschied (<i>Least significant difference</i>)
LT	Lebensdauer
LB-Medium	lysogeny broth
M	Molmasse
m	Masse
MDA	Malondialdehyd
MG	Molekulargewicht

Abkürzungsverzeichnis

N	Anzahl der gewerteten Fälle
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NK	Negativkontrolle
NM	Nährmedium
p	Ergebnis des statistischen Signifikanztests
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PK	Positivkontrolle
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ra	Rohasche
Rfe	Rohfett
Rfa	Rohfaser
RNA	Ribonukleinsäure
Rp	Rohprotein
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sek	Sekunden
spp.	Spezies
SSC	Side Scatter
sV	scheinbare Verdaulichkeit
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (thiobarbituric acid reactive substances)
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TM	Trockenmasse
TS	Trockensubstanz
uS	ursprüngliche Substanz
UV	Ultraviolettstrahlung
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Testvolumen in ml
v	Probevolumen in ml

1. Einleitung

Der Einsatz von phytogenen Futterzusatzstoffen erlangt immer mehr Bedeutung in der Schweineproduktion. Besonders im Bereich der Ferkelaufzucht wird seit dem Verbot der antibiotischen Leistungsförderer 2006 verstärkt nach Alternativen gesucht, da die Zeit des Absetzens die kritischste Phase der Ferkelaufzucht darstellt. Hohe Verlusten stellen Landwirte nicht nur vor ein finanzielles Problem, auch aus Gründen des Tierschutzes müssen Maßnahmen zur Verbesserung der Ferkelgesundheit getroffen werden.

Der Einsatz polyphenolreicher Futterzusätze bei Ferkeln wurde in wenigen Versuchen bereits getestet (Sehm et al. 2007; Blank und Wolfram 2010; Deng et al. 2010), bedarf aber weiterer Untersuchungen. Auch der Einsatz von Bockshornkleesamen bei Absetzferkeln wurde beschrieben (Gärtner 2011), allerdings liegen bisher keine Informationen über die Effekte auf die scheinbare praecaecale Nährstoffverdaulichkeit vor. Da Bockshornkleesamen in *in vitro*-Untersuchungen signifikante antiadhäsive Effekte gegenüber *Escherichia coli* bewirkten (Gärtner 2011), ist deren Einsatz im Hinblick auf die Ferkelgesundheit zum Zeitpunkt des Absetzens interessant.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll zum einen der Einfluss verschiedener pflanzlicher Substanzen auf die Adhäsion zwischen einem enteropathogenen *Escherichia coli*-Stamm und einer intestinalen porcinen epithelialen Zelllinie (IPEC-J2) *in vitro* getestet werden. Zum anderen sollen die Einflüsse eines kommerziellen Ferkelfutters (Fresta F[®]) sowie zweier phytogener Futterzusatzstoffe (Bockshornkleesamen und ein polyphenolreicher Apfelextrakt) auf die Nährstoffverdaulichkeit, die Aktivität ausgewählter intestinaler Enzyme und die Aktivität des natriumabhängigen Glukosetransporters SGLT-1 *in vivo* getestet werden.

2. Literaturübersicht

2.2. Polyphenole

Polyphenole sind aromatische Verbindungen, die in vielen Pflanzen als Tannine (Gerbstoffe), Farb- oder Geschmacksstoffe vorkommen. Diese Stoffe erlangten Aufmerksamkeit aufgrund ihrer antioxidativen Effekte sowie ihrer möglichen gesundheitsfördernden Wirkung. Polyphenole sollen beim Menschen das Risiko von Krebs- und Herzerkrankungen reduzieren. Des Weiteren wird ihnen eine immunmodulatorische, antimikrobielle und antivirale Wirkung zugesprochen (Watzl und Rechkemmer 2001; Bras et al. 2010). Verschiedene *in vitro*-Studien zeigten auch eine antiinflammatorische, antiproliferative und apoptose-induzierende Aktivität von Polyphenolen (Barth et al. 2007).

2.2.1. Herkunft

Die Polyphenole lassen sich in zwei große Gruppen einteilen: die Phenolkarbonsäuren und die Flavonoide. Die Grundstruktur der Flavonoide ist ein 2-Phenylchroman, das Flavan. Durch Modifizierungen am Grundgerüst entstehen Untergruppen. In Tabelle 2.1 ist eine Einteilung der Polyphenole zu finden.

Literaturübersicht

Tabelle 2.1: Einteilung der Polyphenole, wichtigste Vertreter, Vorkommen und Gehalt in Lebens- und Futtermitteln

		wichtigste Vertreter	Vorkommen	Gehalt (mg/kg uS)
Flavonoide				
Procyanidine	Anthocyanidine	Cyanidin	Brombeeren	1000 - 4000
		Malvidin	Kirschen, Rhabarber	350 - 4500 2000
	Flavan-3-ole	Catechin	Bohnen	350 - 550
		Epicatechin	Aprikosen Grüner Tee	100 - 250 100 - 800
	Flavanone	Hesperetin	Grapefruitsaft	100 - 650
		Naringenin	Limettensaft	50 - 300
	Flavone	Apigenin	Sellerie	20 - 140
		Luteolin	Paprika	5 - 10
	Flavonole	Quercetin	Krauskohl	300 - 600
		Myricetin	Brokkoli, Blaubeeren	40 - 100 30 - 160
Isoflavonoide		Kämpferol	Erdbeeren	60 - 210
		Daidzein	Sojabohnen	200 - 900
		Glycitein	Tofu	80 - 700
Chalkone	Phlorizin	Apfel	20 - 390	
Phenolkarbonsäuren				
Hydroxybenzoesäurederivate		Vanillinsäure	Erdbeeren	40 - 130
		Gallussäure	Schwarze Johannisbeeren	
Hydroxymtsäurederivate		Kaffeesäure	Kiwi	600 - 1000
		p-Cumarsäure	Pflaumen	140 - 1150

uS = ursprüngliche Substanz

Flavonoide sind in der Natur weit verbreitet und stellen eine sehr heterogene Gruppe natürlicher Stoffe dar. Es sind ca. 4.000–5.000 verschiedene Flavonoide bekannt (Watzl und Leitzmann 1999). In Pflanzen kommen sie in Form von verschiedenen glykosidischen Verbindungen vor. In der humanen Ernährung gilt Quercetin als eines der am häufigsten vorkommenden Flavonol-Aglykone mit hohen Konzentrationen in verschiedensten Lebensmitteln (Cazarolli et al. 2008).

Flavan-3-ole bilden die Grundsubstanz der Proanthocyanidine, auch Procyanidine genannt. Diese können unter dem Einfluss von Säuren zu Anthocyanidinen umgewandelt werden. Anthocyanidine sind Vorstufen vieler Pflanzenfarbstoffe (Habermehl et al. 2008).

Die Konzentration (20–4.500 mg/kg Frischgewicht) und Art der phenolischen Verbindung in einer Pflanze ist abhängig von Pflanzensorte, Anbaubedingungen, Vegetation und Reife. Besonders hohe Konzentrationen finden sich in den äußeren Schichten der Pflanzenteile, da

Literaturübersicht

die phenolischen Verbindungen dort als eine Art Abwehr gegen äußere Einflüsse fungieren (Schlesier 2002).

In der Literatur und in den meisten Studien werden hauptsächlich verschiedenste Obstsorten sowie schwarzer und grüner Tee als Polyphenolquellen angegeben. Doch Polyphenole sind nicht ausschließlich in Obst und Tee zu finden. Es gibt verschiedene Grünfütterarten, die ebenfalls über hohe Polyphenolgehalte verfügen. *Trifolium* spp. weisen einen hohen Gehalt an Isoflavonen und einigen Flavonoiden auf. Die höchsten Werte konnten in *T. heldreichianum*, *T. scrabum* und *T. subterraneanum* ermittelt werden. Die Isoflavongehalte liegen bei 7-9 % bezogen auf die Trockensubstanz (Oleszek et al. 2007). Eine kurze Übersicht über Polyphenolgehalte in weiteren Futterpflanzen ist in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Polyphenolgehalte in Futterpflanzen (mg/100 g TS) (Bravo 1998)

Schwarze Linsen	540 – 1200
Erbsen	80 – 1710
Bohnen	30 – 280
Grüne Linsen	440 – 800
Gerste	1200 – 1500
Mais	30
Hirse	590 – 1060
Hafer	8,7

2.2.2. Wirkungen

2.2.2.1. Antioxidative Effekte

In aerob lebenden Organismen entstehen bei sauerstoffabhängigen Redoxreaktionen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Durch ihr sehr reaktives Verhalten sind ROS schädlich für Biomoleküle wie die DNA, Membranlipide oder Proteine. Antioxidative Substanzen wie Vitamin E und C sowie körpereigene Enzyme wie die Superoxiddismutase und die Katalase wirken diesen reaktiven Sauerstoffspezies entgegen und haben daher eine protektive Funktion für den Organismus. Auch Flavonoide können durch verschiedene Mechanismen Schäden durch die ROS verhindern. Durch Abgabe eines H^+ -Ions sind Flavonoide in der Lage, freie Radikale zu inaktivieren. Dies geschieht durch Auflösen einer Doppelbindung. In einer Studie wurde diesbezüglich die Wirksamkeit von Emodin *in vivo* getestet. Emodin ist ein Polyphenol, welches aus Rhabarber gewonnen wird. *In vitro* wurde das antioxidative Potenzial von Emodin bereits beobachtet, was anschließend auch *in vivo* bestätigt wurde. Bei intravenöser oder oraler Applikation von Emodin konnten jeweils die antioxidativen Wirkungen gezeigt werden. Es zeigte sich, dass die antioxidative Aktivität nach oraler Applikation höher war als nach intravenöser Applikation. Die antioxidative Aktivität wurde mittel des AAPH-Hämolysetests ermittelt (Shia et al. 2010).

Einige Flavonoide sind als Kupfer- und Eisenchelatbildner bekannt. Dadurch binden sie entscheidende Faktoren für die Entwicklung der freien Radikale. Quercetin ist in der Lage, oxidative Schäden an der Erythrozytenmembran zu verhindern (Wollgast und Anklam 2000; Koncic et al. 2010; Procházková et al. 2011). Weiterhin wurde die induzierende Wirkung von Flavonoiden auf die Aktivierung von Phase-II-Entgiftungsenzymen, wie z. B. der Glutathion-S-Transferase, welches eines der wichtigsten Abwehrenzyme bei oxidativem Stress ist, festgestellt. Dieses war anhand einer höheren Genexpression eines „electrophile responsive element“ (EpRE) induziert, welches die regulatorische Sequenz einiger Gene von Enzymen, wie z. B. der Glutathion-S-Transferase oder der NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase ist (Zhu und Fahl 2001; Procházková et al. 2011). Je höher das Redoxpotenzial eines Flavonoids ist, desto besser ist seine Fähigkeit EpRE zu aktivieren (Procházková et al. 2011). Diese Ergebnisse wurden allerdings in einer *in vivo*-Studie bezüglich der Effekte der Flavonoide Quercetin und Catechin auf die Aktivität von Phase-II-Enzymen nicht bestätigt. Bei diesem Versuch mit Rattenlebern wurde eine Reduktion der Aktivität der Glutathion-S-Transferase durch Quercetin und der NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase 1 durch Catechin beobachtet (Wiegand et al. 2009).

Ein weiterer antioxidativer Mechanismus ist die Hemmung von Oxidasen. Diese Enzyme sind für die Hydroperoxidproduktion verantwortlich. Das Flavon Luteolin hat eine sehr starke hemmende Wirkung auf die Xanthinoxidase (Procházková et al. 2011). Auch für die α -Tocopherylradikale wirken Flavonoide als H^+ -Donator, sodass diese neutralisiert werden. Durch einen synergistischen Effekt von Vitamin C und Flavonoiden auf β -Lipoproteine (LDL) werden diese vor einer Oxidation geschützt (Bieger 2007; Procházková et al. 2011). Das erklärt auch die antiatherosklerotischen Effekte, die den Polyphenolen zugesprochen werden. Die LDL transportieren lipophile Stoffe, wie Cholesterin oder Phospholipide. Bei einer

Oxidation der LDL entstehen atherosklerotische Plaques an den Wänden der Gefäße (Bieger 2007).

Allerdings kam es wiederholt auch zu prooxidativen Wirkungen von Polyphenolen bzw. Flavonoiden. In Gegenwart von Cu^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen verursachten die Flavonoide Myricetin, Kämpferol und Quercetin Strangbrüche in der DNA und Lipidperoxidationen. Es kam zu einer Reduktion von Metallionen und zur Entstehung von ROS durch die Flavonoide. Die prooxidative Wirkung soll von den verfügbaren Übergangsmetallionen und den Redoxpotenzialen möglicher Reaktionspartner abhängen (Böhm 1998).

Das antioxidative Potenzial der Polyphenole hängt maßgeblich von ihrer Struktur und ihren Doppelbindungen ab. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Werte der antioxidativen Aktivität, die man beispielsweise als „Trolox equivalent antioxidative capacity“ (TEAC) angeben kann. Die Definition entspricht der Konzentration eines Vitamin E-Äquivalents (Trolox, 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carbonsäure) in mmol/l, welche über die gleiche antioxidative Kapazität verfügt, wie eine 1,0 mmol/l-Lösung des zu testenden Stoffes. In der nachfolgenden Tabelle 2.3 ist eine Übersicht über die antioxidative Kapazität verschiedener Flavonoide zu finden.

Literaturübersicht

Tabelle 2.3: Antioxidative Aktivität verschiedener Flavonoide in Relation zu Trolox (Vitamin E-Äquivalent) (Pietta 2000)

Flavonoid	TEAC (mM)	Flavonoidgruppe
Epicatechingallat	4,93	Procyanidine
Epigallocatechingallat	4,75	Procyanidine
Quercetin	4,70	Flavonol
Cyanidin	4,40	Anthocyanine
Epigallocatechin	3,80	Procyanidine
Cyanidin-3-rutinosid	3,20	Anthocyanine
Myricetin	3,10	Flavonol
Genistein	2,90	Isoflavon
Epicatechin	2,50	Procyanidine
Quercetin-3-rutinosid	2,42	Flavonol
Catechin	2,40	Procyanidine
Luteolin	2,09	Flavon
Taxofolin	1,90	Flavanonol
Luteolin-4'-Glucosid	1,74	Flavon
Naringenin	1,50	Flavanon
Galangin	1,49	Flavonol
Apigenin	1,45	Flavon
Chrysin	1,43	Flavon
Hesperetin	1,40	Flavanon
Dihydroxykämpferol	1,39	Flavanonol
Kämpferol	1,34	Flavonol
Pelargonidin	1,30	Anthocyanine
Daidzein	1,25	Isoflavon
Genistein-7-glucosid	1,24	Isoflavon
Biochanin	1,16	Isoflavon
Naringenin-7-rutinosid	0,80	Flavanon

TEAC= Trolox Equivalent Antioxidative Capacity

2.2.2.2. Antimikrobielle Effekte

In einem *in vitro*-Versuch wurden die Effekte von pflanzlichen Polyphenolen bezüglich der Adhäsion und der Toxinbindung eines enterotoxischen *E. coli*-Stammes getestet. Hierzu

wurden Polyphenolextrakte aus der Kakaobohne, aus Pentagalloyl-Glukose (sekundärer Pflanzenstoff aus dem Essigbaum) und aus hydrolysierbaren Tanninen gewonnen. An aus Schweinen isolierten Bürstensaummembranen wurden die hemmenden Effekte der Polyphenole auf die Adhäsion eines *E. coli*-Stammes getestet. Alle drei Polyphenolextrakte hemmten die Adhäsion des F4 (K88) positiven *E. coli*-Stammes (Verhelst et al. 2010). Auch die antimikrobielle Aktivität von schwarzem Tee bezüglich verschiedener pathogener Bakterien wie *E. coli* wurde in einem Versuch beobachtet. Einer der Wirkmechanismen beruht auf der Einwirkung in den Eisenstoffwechsel der Bakterien. Flavonoide sind in der Lage, Eisen von eisenabhängigen Mikroorganismen wie *E. coli* abzusondern und somit deren Wachstum zu hemmen (Bruins et al. 2011). In einem weiteren Versuch wurde ein Extrakt aus schwarzem Tee in zwei verschiedenen Konzentrationen an Absetzferkel verfüttert, die oral mit enterotoxischen *E. coli*-Keimen infiziert wurden. Dabei wurde die Durchfallhäufigkeit ermittelt. Die deutlichsten Unterschiede waren ab dem 13. Tag nach dem Absetzen bzw. dem siebten Tag *post infectionem* festzustellen. Hier kam es zu einem Abfall der Durchfallprävalenz bei der Gruppe mit der höchsten Teekonzentration. Die Durchfallprävalenz senkte sich bis zum zwölften Tag *post infectionem* um 20 % gegenüber der Kontrollgruppe (Bruins et al. 2011).

2.2.2.3. Effekte der Polyphenole auf Verdauungsenzyme und Nährstoffaufnahme

In der Humanforschung gibt es viele Studien und Untersuchungen bezüglich der inhibitorischen Einflüsse von Kräutern, Gewürzen und ätherischen Ölen auf verschiedene Verdauungsenzyme. Bei an Diabetes erkrankten Patienten oder auch bei Übergewichtigen ist dies ein erwünschter Effekt, da auf diese Weise der Glukosespiegel im Blut gesenkt werden kann. Aber nicht nur die kohlenhydratspaltenden Verdauungsenzyme wie α -Amylase oder α -Glucosidase, sondern auch Lipasen oder Peptidasen können durch verschiedene Gewürze oder Obstextrakte in ihrer Aktivität gehemmt werden (Grussu et al. 2011; Gu et al. 2011; Rubilar et al. 2011). Die für die Hemmung verantwortlichen Stoffe wurden teilweise identifiziert. In einer Studie wurde der hemmende Effekt von Himbeer- und Vogelbeerenextrakten bezüglich der α -Amylase getestet. Hier stellte sich heraus, dass Ellagatannin, eine Phenolkarbonsäure, aus der Himbeere und Proanthocyane aus der Vogelbeere für die Hemmung der α -Amylase durch Bindung an das aktive Zentrum verantwortlich sind (Grussu et al. 2011). Ein *in vitro*-Versuch mit Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) zeigte die inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der α -Amylase, des Chymotrypsins, des Trypsins und sogar der Laktase. Die Hemmung wurde bei allen Enzymen durch den Speichel, welcher sehr prolinreiche Proteine enthält, abgeschwächt. Der Speichel ist zudem stabil genug, um bis an den Sekretionsort der Laktase zu gelangen, sodass diese damit vor einer Hemmung geschützt ist (Naz et al. 2011).

Nicht nur die hemmenden Effekte der Polyphenole auf Verdauungsenzyme sind von Bedeutung. Das Interesse liegt auch bei der Aufklärung des genauen Wirkmechanismus. Um die Fähigkeit der Polyphenole bezüglich der Enzymhemmung besser zu verstehen, wurden hemmende Effekte von Procyanidinen bezüglich der Pankreaslipase getestet. Procyanidine (kondensierte Tannine) haben eine lange polymerische Struktur und werden dadurch im Darm schlecht absorbiert. Sie verbleiben aufgrund dessen eine längere Zeit im Verdauungstrakt. Einige Studien haben gezeigt, dass diese Polyphenolkomplexe mit Proteinen reagieren bzw. diese binden können. Diese Polyphenolbindung könnte der Grund für die Denaturierung

der Enzyme und damit für den Verlust ihrer Aktivität sein. Weiterhin gibt es Unterschiede in Bezug auf die Art der chemischen Verbindung. Die hemmende Wirkung von polymerisierten Procyanidinen ist wesentlich höher als die des Trimers oder Tetramers. Dies könnte daran liegen, dass Polymere mehr van-der-Waals-Bindungen und Wasserstoffbrücken zwischen ihren hydrophoben und Hydroxylgruppen und den Aminosäureresten im aktiven Zentrum aufbauen. Auf diese Weise könnten diese Polymere das aktive Zentrum des Enzyms „abschirmen“ bzw. blockieren, was einen weiteren Wirkmechanismus der Enzymhemmung darstellen könnte (Bras et al. 2010; Naz et al. 2011).

Polyphenolische Verbindungen aus Tee, Epicatechingallat (ECG) und Epigallocatechingallat (EGCG), haben eine inhibitorische Wirkung auf den natriumabhängigen Glukosetransporter 1. In einem *in vitro*-Versuch mit Bürstensaummembranvesikeln aus Kaninchenjejunum wurde der Einfluss von ECG und EGCG auf die Na⁺-abhängige Glukoseaufnahme getestet. Im Vergleich zur Negativkontrolle war die Glukoseaufnahme bei ECG um 55 % und bei EGCG um 45 % erniedrigt. In der gleichen Studie wurde der Einfluss von ECG und EGCG auf die Glukoseaufnahme in jejunalen Zellen aus Ratten gemessen. Auch hier war die Glukoseaufnahme unter Einfluss der Teepolyphenole im Vergleich zur Negativkontrolle um 45 % bei ECG bzw. um 25 % bei EGCG gesenkt (Kobayashi et al. 2000).

In Tabelle 2.4 sind die Dosis-Wirkungsbeziehungen von einigen Polyphenolen in Bezug auf verschiedene Verdauungsenzyme dargestellt. Hier zeigt sich, dass die hemmende Wirkung nicht nur von der Verarbeitungsart der Polyphenolquelle abhängt, sondern dass auch die verarbeiteten Pflanzenteile eine ebenso große Rolle spielen.

Literaturübersicht

Tabelle 2.4: Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen Polyphenolgehalten und der resultierenden Enzymhemmung aus *in vitro*-Studien

Polyphenolquelle	Gehemmtes Enzym	Verantwortliches Polyphenol	Menge des Polyphenols in µg/ml	Prozent der noch vorhandenen Enzymaktivität	Referenz	
Gelber HE	α-A	Cyanidin	17	50	(Grussu et al. 2011)	
			50	0		
Roter HE			13	50		
			50	0		
Kakao	PA	Procyanidine	200	75		(Gu et al. 2011)
	PL		47	50		
Guaveblätter	α-A	Procyanidine	80	50	(Rubilar et al. 2011)	
Guavestamm			57			
Guaveblätter	α-G	Quercetin	13			
Guavestamm			39			
Rosmarinextrakt	HPL	Rosmarinsäure	95	50	(Bustanji et al. 2010)	
		Chlorogensäure	14			
		Kaffeesäure, Gal- lussäure				

HE = Himbeerextrakt; α-G = α-Glucosidase ; α-A = α-Amylase; HPL = hormonsensitive Pankreaslipase, PL = Pankreaslipase;

PA = Pankreasamylase

Literaturübersicht

Aufgrund der Vielzahl an verschiedenen Polyphenolen ist auch das Wirkspektrum sehr groß. Viele Studien untersuchten die gleichen Stoffe auf unterschiedlichste Wirkungen oder verschiedene Stoffe bezüglich bestimmter Effekte. Tabelle 2.5 zeigt eine kurze Übersicht über verschiedene Flavonoide und ihre Wirkungen.

Literaturübersicht

Tabelle 2.5: Nachgewiesene Wirkungen von Flavonoiden

Stoff	Wirkung	Referenz
Apigenin	Antibakteriell	(Cazarolli et al. 2008; Akroum et al. 2009)
Catechin	Antioxidativ Hemmung der Brust- und Prostatakrebszellen	(Rice-Evans et al. 1996) (Cazarolli et al. 2008)
Cyanidin	Antioxidativ Hemmung der α -Amylase	(Rice-Evans et al. 1996) (Grussu et al. 2011)
Emodin	Laxans Radikalfänger	(Frey und Löscher 2009) (Shia et al. 2010)
Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG)	Hemmung der α -Amylase, Trypsin, Chymotrypsin Hemmung des Natrium-Glukose-Transporters SGLT-1	(Naz et al. 2011) (Kobayashi et al. 2000)
Hesperetin	Hemmung der Phospholipase A2	(Cazarolli et al. 2008)
Kämpferol	Antioxidativ Hemmung der α -Amylase, Pankreaslipase Hemmung der Phospholipase A2	(Rice-Evans et al. 1996) (Rubilar et al. 2011) (Cazarolli et al. 2008)
Luteolin	Antibakteriell Hemmung der α -Glucosidase Antioxidativ	(Akroum et al. 2009) (Koga et al. 2006) (Rice-Evans et al. 1996)
Malvidin	Antibakteriell	(Akroum et al. 2009)
Myricetin	Antioxidativ Hemmung der Phospholipase A2	(Rice-Evans et al. 1996) (Cazarolli et al. 2008)
Naringenin	Hemmung der Phospholipase A2	(Cazarolli et al. 2008)
Phlorizin	Hemmung des Natrium-Glukose-Transporters SGLT-1	(Kobayashi et al. 2000)
Procyanidine	Hemmung der Pankreaslipase, Pankreasamylase, Phospholipase A2	(Gu et al. 2011)
Quercetin	Antioxidativ Hemmung der α -Amylase, Pankreaslipase Hemmung der 15-Lipoxygenase, Hemmung der Phospholipase A2 Hemmung der LDL-Oxidation Antibakteriell	(Rice-Evans et al. 1996) (Rubilar et al. 2011) (Jan et al. 2010) (Cazarolli et al. 2008) (Akroum et al. 2009)

Der Großteil der bisherigen Studien und Versuche fand *in vitro* statt. Es ist daher notwendig, die getesteten Wirkungen der Polyphenole *in vivo* zu bestätigen. Äpfel zeichnen sich durch einen hohen Polyphenolgehalt aus, sind zudem schmackhaft und in der traditionellen Medizin für ihre gesundheitsfördernden Wirkungen bekannt. Daher eignen sich Extrakte prinzipiell für Fütterungsversuche. Im weiteren Verlauf wird auf Eigenschaften und Wirkungen der polyphenolischen Inhaltsstoffe von Äpfeln eingegangen.

2.2.3. Polyphenole aus Äpfeln

Äpfel sind als Polyphenolquelle bekannt und wurden in Fütterungsversuchen als Trester bereits eingesetzt. Der Polyphenolgehalt ist abhängig von der Apfelsorte, dem Reifegrad und dem Anteil der Frucht (Vrhovsek et al. 2004). In einer Studie wurden die Polyphenolgehalte von verschiedenen Apfelsorten ermittelt. In der folgenden Tabelle 2.6 sind die Werte der Apfelsorten mit den höchsten und den niedrigsten Gehalten sowie die Durchschnittswerte aller sieben Apfelsorten aufgeführt.

Tabelle 2.6: Polyphenolgehalte von Äpfeln in mg/100 g uS (Vrhovsek et al. 2004)

Sorte	Red Delicious	Fuji	Durchschnitt aus 7 getesteten Apfelsorten
Hydroxycimtsäuren	9,8	13,4	10,7
Flavanole	112,4	52,2	81,0
Anthocyanine	2,5	0,4	1,6
Dihydrochalcone	4,3	2,0	2,5
Flavonole	5,8	4,7	5,9
Gesamtpolyphenole	134,8	72,7	101,7

In einer Studie mit Apfelsaftextrakten wurde eine Reduktion der oxidativen Zellschädigung an humanen Kolonzelllinien beobachtet (Schaefer et al. 2006). Auch für die Tierernährung können Polyphenole positive Effekte erzielen. So wurde in einem Fütterungsversuch mit Apfeltrester bei Schweinen eine positive Beeinflussung von Darmflora und der histologischen Struktur der Darmwand festgestellt, welche sich in einem Anstieg der Zottenhöhe im Ileum. Weiterhin zeigte sich, dass die Fläche der Darmzotten des Jejunums der Kontrollgruppe um 30 % geringer war als die der Apfeltrestergruppe (Sehm et al. 2007).

Ein in Äpfeln vorkommendes Glykosid aus der Gruppe der Chalkone ist das Phlorizin. Phlorizin kann den natriumabhängigen Glukosetransporter 1 hemmen. Der natriumabhängige Glukosetransporter 1 transportiert Glukose in die Epithelzelle und ist mitverantwortlich für die Rückresorption von Glukose in den Nieren. Auch der Glukoserücktransport aus den Nieren kann durch Phlorizin gehemmt werden, sodass es zu einer Glukosurie kommt (Kobayashi et al. 2000; Ehrenkranz et al. 2005).

Die Gruppe der Flavonoide ist die größte bekannte Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe. Mittlerweile sind 4000 - 5000 verschiedene Flavonoide bekannt (Watzl und Leitzmann 1999). Nachfolgend wird auf einen der wichtigsten Vertreter der Flavonoide, das Quercetin, eingegangen.

2.2.4. Quercetin

Quercetin ist eines der bekanntesten Flavonoide und gehört zur Gruppe der Flavonole. Die Nomenklatur für Quercetin nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) lautet 3,3',4',5,7-pentahydroxy-2-phenylchromen-4-one. Quercetin ist definiert als ein Aglykon, welches sich in kaltem Wasser nicht, in heißem Wasser etwas besser löst. In Alkohol ist dieses Aglykon löslich. Quercetin bewirkt eine gelbe Farbe der Pflanze. In der Pflanze selbst liegt Quercetin, ebenso wie alle Flavonoide, fast ausschließlich als Glykosid vor. Dafür wird eine OH-Gruppe zugunsten eines Zuckermoleküls ausgetauscht. Bei Quercetin geschieht dies meist an der dritten Position. Dieses Glykosid ist für z. B. ein verändertes Löslichkeitsverhalten, die Absorption und *in vivo* Effekte verantwortlich. Durch eine gebundene Glykosylgruppe erhöht sich die Löslichkeit der Quercetinglykoside im Vergleich zu einem Quercetinaglykon. Die Unterschiede zwischen den Quercetinglykosiden hängen dementsprechend von der Art der Glykosylgruppe ab (Kelly 2011). Bisher sind 179 verschiedene Glykosidformen von Quercetin entdeckt worden (Watzl und Rechkemmer 2001). Am häufigsten liegt das Quercetin mit einem oder zwei gebundenen Glukosemolekülen oder mit gebundener Rutinose vor (Kelly 2011). Frühere Studien besagten, dass Flavonoide, die über eine glykosidische Bindung verfügen, im Dünndarm fast nicht absorbiert werden könnten, da sie durch intestinale Enzyme nicht hydrolysiert würden (Böhm 1998). Dies wurde allerdings mittlerweile in verschiedenen Studien widerlegt. Bei oraler Aufnahme von Quercetinglykosiden werden diese durch β -Glucosidasen hydrolysiert, sodass Quercetin in Form eines Aglykons vorliegt (Kelly 2011). Diese Aglykone oder auch bereits oral aufgenommene Quercetinaglykone werden im Dünndarm absorbiert und werden anschließend zu Sulfaten und Glucuroniden, besonders in der Leber, umgebaut (Böhm 1998; Watzl und Rechkemmer 2001).

Quercetin und Quercetinglykoside sind in vielen verschiedenen Pflanzen zu finden. Dazu gehören Äpfel, Beeren, diverse Kohllarten, Kapern, Zwiebeln, Tee, Tomaten, diverse Samen, Nüsse und Blumen (Kelly 2011). Die nachfolgende Tabelle 2.7 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Quercetinglykoside in Äpfeln.

Tabelle 2.7: Quercetingehalt in Äpfeln (Neveu et al. 2010)

	Gehalt in mg/100 uS
Quercetin	0,13
Q-3-O-Arabinoside	1,40
Q-3-O-Galactoside	2,36
Q-3-O-Glucoside	0,64
Q-3-O-Rhamnoside	1,33
Q-3-O-Rutinoside	0,23
Q-3-O-Xyloside	0,78
Gesamt	6,87

Es sind viele Studien zur Wirkung des Quercetins *in vitro* sowie *in vivo* verfügbar. Der Tabelle 2.8 ist eine Übersicht der unterschiedlichen Wirkungen von Quercetin zu entnehmen.

Tabelle 2.8: Wirkungen des Quercetins

Wirkung		Referenz
Antioxidativ	TEAC = 4,7 mM	(Rice-Evans et al. 1996)
Hemmung der α -Amylase und der Pancreaslipase		(Rubilar et al. 2011)
Hemmung der 15-Lipoxygenase, Phospholipase A2, COX		(Cazarolli et al. 2008)
Antiinflammatorisch	Unterdrückung IgE-Antwort; Reduktion Histamin-Plasmas	(Rogerio et al. 2010)
Antikarzinogen		(Kelly 2011)
Milderung kardialer Hypertrophie	Induziert durch Bluthochdruck	(Kelly 2011)
Hemmung der Aldosereduktase		(Kelly 2011)
Reduktion Ulcera	Ethanol-induzierte	(Kelly 2011)
Antibakteriell	<i>Staph. aureus</i> , <i>E.coli</i>	(Rauha et al. 2000)
Antiviral	HIV-Proteinase	(Middleton et al. 2000)
Protektiv gegen Shigella		(Vijaya und Ananthan 1996)

2.2.5. Polyphenole in der Tierernährung

Bisher gibt es nur wenige wissenschaftliche Fütterungsversuche mit Polyphenolen in der Tierernährung. Eine der wenigen Studien untersuchte den Einfluss von zwei verschiedenen Konzentrationen von Holunderrester (0,4; 1,0 %) auf das Wachstum und die antioxidativen Parameter bei Absetzferkeln. Es konnten in den beiden mit Holunderrester gefütterten

Gruppen sowohl höhere Futterraufnahmen (um 8,4 und 6,1 %) sowie verbesserte Lebendmassenzunahmen nach vier Wochen (um 6,3 % und 4,8 %) festgestellt werden. Die Autoren vermuteten, dass dieses der erhöhten Schmackhaftigkeit des Futters zuzuschreiben war. Weiterhin stellte sich heraus, dass der Holundertrester weder Einfluss auf die antioxidative Kapazität des Blutplasmas noch auf die α -Tocopherolgehalte des Plasmas hatte. Aufgrund des relativ hohen Gehaltes an Fett mit hohen Anteilen ungesättigter Fettsäuren im Holundertrester wird der Bedarf an Vitamin E als Antioxidans eher verstärkt (Blank und Wolfram 2010).

In einem weiteren Versuch wurden ebenfalls Reststoffe aus der Lebensmittelindustrie, in diesem Fall Apfel- und Rotweintrester genutzt. Diese wurden an Schweine verfüttert, um die möglichen Effekte auf das Verdauungssystem zu testen. Dabei stellte sich heraus, dass die beiden Trester einen positiven Einfluss auf die Darmmorphologie hatten. Bei den Ferkeln, die mit einer Standarddiät gefüttert wurden, zeigte sich eine Abnahme der Zottenhöhe nach dem Absetzen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Apfeltrestergruppe keine Veränderung in der Zottenhöhe nach dem Absetzen (Sehm et al. 2007).

Um die antioxidative Wirkung von Teepolyphenolen *in vivo* zu testen, wurden diese in einer Studie an Absetzferkel, die mit Diquat künstlich unter oxidativen Stress gesetzt wurden, verfüttert. Dies führte zu einer Reduktion der Futterraufnahme und damit auch der Tageszunahmen. Durch die Polyphenole konnten die Werte der Futterraufnahme sowie der durchschnittlichen Tageszunahmen verbessert werden. Auch die durch Diquatbehandlung ansteigenden Werte der Serumzytokine IL-1, IL-4 und IFN- γ nahmen durch die Teepolyphenolsupplementation wieder ab. Bezüglich verdauungsphysiologischer Parameter wurden hier keine Untersuchungen durchgeführt (Deng et al. 2010).

Auch in der Geflügelproduktion sind pflanzliche Futterzusatzstoffe immer mehr von Interesse. So wurde der Zusatz von Flavonoiden und Mannanligosacchariden im Vergleich zu Probiotika und Antibiotika an Broilern getestet. Es ergaben sich keine Verbesserungen bezüglich der Futterraufnahme, der Tageszunahmen, der Mortalität oder des Endgewichtes. Allerdings konnte eine Verbesserung des Futteraufwands in der Gruppe, die mit Flavonoiden und Mannanligosacchariden gefüttert wurde, beobachtet werden (Batista et al. 2007). In einem weiteren Fütterungsversuch mit Broilern wurden die Effekte von Antibiotika, ätherischen Ölen und Polyphenolen aus Rosmarin, Salbei und Thymian beobachtet. Hier zeigte sich eine Verbesserung der fäkalen und der praecaecalen Verdaulichkeit bei der mit Polyphenol gefütterten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Hernandez et al. 2004). Der hohe Polyphenolgehalt in Propolis wurde in einem Fütterungsversuch mit Broilern genutzt. Dazu wurde ein ethanolischer Propolisextrakt an Broiler verfüttert, wodurch es zu einer Erhöhung der Gewichtszunahme und einem günstigeren Futteraufwand kam. Weiterhin konnte ein Rückgang der Mortalität beobachtet werden. Allerdings wurden diese positiven Effekte erst bei hohen Dosen (200 - 250 mg/kg) des Propolisextrakts beobachtet. Der genaue Polyphenolgehalt in der Propolis wurde allerdings nicht ermittelt (Khojasteh Shalmany 2006).

Aufgrund der vielen verfügbaren natürlichen Polyphenolquellen und deren vielfältigen Inhaltsstoffen, die zudem auch umfangreiche Wirkungen auf Gesundheits- und Verdauungsparameter haben, besteht ein Interesse diese in weiteren Versuchen genauer zu erforschen. Besonders *in vivo*-Studien sind von Interesse, da der größte Teil der bisherigen Untersuchungen auf *in vitro*-Verfahren beruht. Auch wurden viele Humanstudien durchgeführt, deren Forschungshintergründe sich nicht immer mit denen der Tierernährung decken. So ist eine Hemmung der Verdauungsenzyme in der Tierproduktion nicht wünschenswert, da hierdurch ein negativer Effekt auf die Futtereffizienz resultieren könnte. Im Bereich der Humanstudien liegt der Fokus auf hypoglykämischen Wirkungen, die im Bereich der Diabetesbehandlung von Interesse sind.

2.3. Bockshornklee

Bockshornklee, *Trigonella foenum graecum*, gehört zu den Leguminosen und der Samen wird häufig als Gewürz, die Blätter als Gemüse verwendet. Er wird als eine der ältesten medizinisch genutzten Pflanzen in der traditionellen Heilkunde zum Beispiel bei Diabetes, Rachitis, Rheuma, Schwäche, Beinödemen, Alopezie, Verdauungsstörungen oder Anämie verwendet (Basch et al. 2003). Besonders den Samen des Bockshornklees werden nutritive und verdauungsfördernde Eigenschaften zugesprochen (Suja Pandian et al. 2002).

2.3.1. Zusammensetzung des Bockshornkleesamens

Die Inhaltsstoffe der Bockshornkleesamen sind der Tabelle 2.9 zu entnehmen. Die Samen des Bockshornklees weisen einen hohen Gehalt an Mineralstoffen wie Kalzium, Phosphor, Zink, Mangan und Eisen im Vergleich mit anderen Leguminosen auf. Weiterhin sind die Samen auch reich an Saponinen, enthalten Flavonoide, Carotinoide und Kumarine (Basu und Srichamroen 2010).

Tabelle 2.9: Inhaltsstoffe von Bockshornkleesamen (Basu und Srichamroen 2010)

Protein	20 – 30 %
Fett	6 – 10 %
Kohlenhydrate	44 – 59 %

Es wird allgemein angenommen, dass die Bockshornkleesamen drei aktive Komponenten enthalten, welche für die gesundheitsfördernden Wirkungen verantwortlich sind. Diese Komponenten sind Saponine, Galaktomannane und 4-Hydroxy-Isoleucin (Basu und Srichamroen 2010).

Saponine kommen in einer Vielzahl von Pflanzen vor, besonders häufig sind sie jedoch in Leguminosen zu finden. In ihrer Struktur können sie sehr unterschiedlich sein. Die Gemeinsamkeit aller Saponine ist der Zuckerrest, welcher mit einem Triterpenoid- oder Steroidteil verbunden ist (Watzl und Leitzmann 1999). Die in Bockshornkleesamen vorkommenden Saponine gehören zur Gruppe der steroidalen Saponine (Basu und Srichamroen 2010). Aufgrund der Vielfalt chemischer Strukturen in der Gruppe der Saponine sind die verschiedenen Wirkungen im menschlichen oder tierischen Organismus immer nur einem bestimmten Saponin zuzuordnen. Der Tabelle 2.10 ist eine Übersicht der spezifischen Wirkungen von Saponinen aus Bockshornkleesamen zu entnehmen.

Galaktomannane sind Polysaccharide, welche aus Galaktose und Mannose bestehen. Sie kommen gehäuft in den Zellwänden des Endosperms von Leguminosensamen vor. Galaktomannane unterscheiden sich strukturell in ihrem Galaktose-Mannose-Verhältnis, welches im Bockshornkleesamen 1:1,4 beträgt. Durch diese strukturellen Eigenschaften sind die Galaktomannane aus Bockshornkleesamen in der Lage, die Viskosität der Ingesta im Darm zu

erhöhen (Basu und Srichamroen 2010). Die Tabelle 2.10 führt eine Übersicht zu den verschiedenen Wirkungen der Galaktomannane aus Bockshornkleesamen auf.

4-Hydroxy-Isoleucin ist eine Aminosäure, die ausschließlich in einigen ausgewählten Pflanzen vorkommt. In Bockshornkleesamen liegt diese Aminosäure als Diastereoisomer vor (Basu und Srichamroen 2010). Es gibt bisher nur wenige Studien über die Wirkung von 4-Hydroxy-Isoleucin. Die nachfolgende Tabelle 2.10 gibt einen kurzen Überblick.

Tabelle 2.10: Wirkungen der aktiven Komponenten aus Bockshornkleesamen

	Wirkung	Referenz
Saponine	Hypocholesterämisch	(Basu und Srichamroen 2010)
	Hemmung der Produktion von inflammatorischen Zytokinen in THP-1-Zellen und die Melanogenese in B16F1-Zellen	(Kawabata et al. 2011)
	Antifungal	(Sauvaire et al. 1996)
	Verbesserung der Adipocytendifferenzierung und Hemmung von Entzündungen im Fettgewebe	(Uemura et al. 2010)
	Hämolytisch	(Elmadfa und Koken 1980)
Galaktomannane	Erhöhung von intestinalen Verdauungsenzymen in an Diabetes erkrankten Ratten	(Hamden et al. 2010)
	Erhöhung der Phagozytoserate von peritonealen Makrophagen	(Ramesh et al. 2002)
	Hypoglykämisch	(Basu und Srichamroen 2010)
4-Hydroxy-Isoleucin	Stimulation der Insulinsekretion	(Basu und Srichamroen 2010)

Aufgrund der vielen positiven Effekte, die der Bockshornklee und dessen Samen in der traditionellen Medizin zeigen, ist es auch in der Veterinärmedizin von großem Interesse, mögliche positive Einflüsse zu erforschen.

2.3.2. Hypoglykämische, antidiabetogene Effekte und Wirkungen auf den Verdauungstrakt

Bockshornklee gewinnt zunehmend an Bedeutung in der humanen Diabetesforschung, da er eine blutzuckersenkende Wirkung hat. In einer Studie bezüglich der therapeutischen Wirkungen von Bockshornklee wurde die Erhöhung der glukoseinduzierten Insulinabgabe in humanen Pankreaszellen und in Pankreaszellen von Ratten durch die Aminosäuren in den Bockshornkleesamen beobachtet. Auch konnte eine Erhöhung der Insulinrezeptoren und

eine Senkung der Glukosekonzentration im Plasma verzeichnet werden. Allerdings ist der genaue Wirkungsmechanismus noch nicht geklärt (Basch et al. 2003). Die Hemmung der intestinalen Disaccharidasen von an Diabetes erkrankten Mäusen durch Galaktomannane aus Bockshornkleesamen konnte in einer weiteren Studie belegt werden. Die Galaktomannane konnten die Aktivitäten von Laktase, Maltase und Saccharase in Mäusen fast auf das Niveau der gesunden Kontrollgruppe senken. Auch der Blutglukosespiegel sank bei den diabetischen Tieren um 50 % ab (Hamden et al. 2010). Die hypoglykämische Wirkung der Galaktomannane wird auf deren chemische Struktur zurückgeführt. Da die Galaktomannane die Viskosität der Digesta im Darm erhöhen, kommt es zu einer längeren Verweildauer des Chymus im Darm. Eine längere Verweildauer bedingt einen verzögerten Kohlenhydratabbau, sodass die postprandiale Glukoseanflutung im Blut verzögert wird (Basu und Srichamroen 2010). Die hypoglykämische Wirkung der Galaktomannane wurde in einer Studie mit unter- und übergewichtigen Ratten bestätigt. Hier wurde eine reduzierte Glukoseaufnahme bei steigender Galaktomannankonzentration beobachtet (Srichamroen et al. 2009).

Im Zuge der Erforschung antidiabetogener Effekte von Bockshornkleesamen wurden in einer *in vitro*-Studie verschiedene Extrakte (ethanolisch, saponinfrei, sapogeninhaltig, saponinhaltig) angefertigt und deren Effekte auf die Glukoseaufnahme durch den natriumabhängigen Glukosetransporter SGLT-1 und die Aktivität der hepatischen Glykogenphosphorylase an Kaninchenbürstensaummembranen verglichen. Dabei zeigte sich, dass alle Extrakte in der Lage waren, die Glukoseaufnahme zu reduzieren. Verglichen mit der Kontrollprobe hemmten der Sapogeninextrakt (Aglykone) und der Saponinextrakt die Glukoseaufnahme am stärksten (81 % bzw. 77 %) bei einer Konzentration von 3,3 mg/ml Testsubstanz. Verglichen mit dem Polyphenol Phlorizin, welches ein potenter SGLT-1-Inhibitor ist, zeigten die beiden Substanzen Diosgenin und Trigonellin eine deutlich schwächere Hemmung. Weiterhin wurden bei einer Konzentration von 0,33 mg/ml Testsubstanz deutlich geringere hemmende Effekte durch die Extrakte gemessen (Al-Habori et al. 2001).

Der Einfluss der Bockshornkleesamen auf den Fettstoffwechsel wurde eingehend untersucht. Ein hypocholesterämischer Effekt wird den Saponinen zugesprochen. In den Bockshornkleesamen sind fünf bis sechs Prozent Saponine in Form von Diosgenin enthalten. Diese sollen in der Lage sein, Gallensäuren zu binden. Somit wird die Gallensalzreabsorption im Darm verringert und vermehrt Cholesterin ausgeschieden, wodurch es zu einer verringerten Plasmacholesterolkonzentration kommt (Basu und Srichamroen 2010).

In einer Studie zeigte sich eine protektive Wirkung von Bockshornkleesamen auf experimentell durch Ethanol induzierte Läsionen der Magenschleimhaut bei Ratten. Ein wässriger Bockshornkleeextrakt bzw. eine Bockshornkleeextraktgelfraktion reduzierte die Bildung der Magenuzera um über 50 %. Weiterhin war der Schweregrad der Läsionen bei der Gruppe, die mit Bockshornkleesamen gefüttert wurde, niedriger als in der Kontrollgruppe. Verglichen mit der Gabe von Omeprazol, einem H₂-Blocker, war der wässrige Bockshornkleeextrakt ebenso wirksam, die Gelfraktion des Samens war sogar effektiver in Bezug auf die Magenuzera. Die antisekretorische Aktivität der Samen auf den Magensaft schien eine protektive Rolle auf die Mukosa im Magen auszuüben. Die Autoren vermuten, dass die Zusammensetzung der Polysaccharide und die Flavonoide für die gastroprotektive Wirkung verantwortlich sind (Suja Pandian et al. 2002).

In vitro und *in vivo*-Untersuchungen an Ratten zeigten, dass Bockshornklee die Aktivität der intestinalen Disaccharidasen Maltase, Laktase und Saccharase sowie der intestinalen Lipase

bei einer einmaligen Gabe von 40 mg zum Teil signifikant erhöhte. Die Gabe von 2 g Bockshornklee/kg TS des Futters führte mehrheitlich zu einer Senkung der Aktivität der Verdauungsenzyme. Die Aktivitäten der Pankreaslipase und des Chymotrypsins wurden jeweils um 42 % erhöht. *In vitro* führte der Einsatz von Bockshornklee in Konzentrationen von 0,1 mg/ml bzw. 1,0 mg/ml mehrheitlich zu einer Senkung der Aktivität von verschiedenen Verdauungsenzymen (Platel und Srinivasan 1996; Platel und Srinivasan 2000; Ramakrishna Rao et al. 2003), was der Tabelle 2.11 zu entnehmen ist. Die Verweilzeit der Nahrung im Magen-Darm-Trakt von Ratten, wurde durch Bockshornkleesamen nicht beeinflusst, was durch Zugabe des Indikators Eisenoxid gemessen wurde (Platel und Srinivasan 2001).

Literaturübersicht

Tabelle 2.11: Wirkung von Bockshornklee auf die Aktivität verschiedener Verdauungsenzyme von Ratten

	Enzym	Konzentration	Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe	
In vivo	Intestinale Lipase	2 g/kg TM	↓ 13 %	
		Einmalig 40 mg	↑ 58 %	
	Saccharase	2 g/kg TM	↓ 31 %	
		Einmalig 40 mg	↑ 15 %	
	Laktase	2 g/kg TM	↓ 12 %	
		Einmalig 40 mg	↑ 26 %	
	Maltase	2 g/kg TM	↓ 3 %	
		Einmalig 40 mg	↑ 6 %	
	Pankreaslipase	2 g/kg TM	↑ 42 %	
		Einmalig 40 mg	↓ 37 %	
	Pankreasamylase	2 g/kg TM	↓ 25 %	
		Einmalig 40 mg	↑ 17 %	
	Trypsin	2 g/kg TM	↓ 60 %	
		Einmalig 40 mg	↑ 12 %	
	Chymotrypsin	2 g/kg TM	↑ 42 %	
		Einmalig 40 mg	↓ 29 %	
	In vitro	Saccharase	0,1 mg/ml	↓ 4 %
			1,0 mg/ml	↑ 2 %
Laktase		0,1 mg/ml	↓ 2 %	
		1,0 mg/ml	↓ 42 %	
Maltase		0,1 mg/ml	↓ 11 %	
		1,0 mg/ml	↓ 13 %	
Pankreaslipase		0,1 mg/ml	↓ 53 %	
		1,0 mg/ml	↓ 50 %	
Pankreasamylase		0,1 mg/ml	↑ 25 %	
		1,0 mg/ml	↑ 72 %	
Chymotrypsin		0,1 mg/ml	↑ 5 %	
		1,0 mg/ml	↓ 28 %	

(Platel und Srinivasan 1996; Ramakrishna Rao et al. 2003)

2.3.3. Weitere Wirkungen

An Mäusen wurden analgetische und antiinflammatorische Wirkungen von gereinigtem Bockshornkleesamenextrakt in verschiedenen Konzentrationen (5 - 40 mg/kg Körpermasse) getestet und mit den Analgetika Diclofenac und Pentazocin verglichen. Bei einer Dosis von 40 mg/kg des Bockshornkleesamenextraktes wurde eine Reduktion von Schmerzreaktionen nach chemischer bzw. thermischer Provokation um 75 % verzeichnet. Die Gabe von Diclofenac reduzierte die Schmerzäußerungen um 63 %. Es zeigte sich eine akute inflammatorische Reaktion, die mit der Produktion von Prostaglandin E₂ und Prostaglandin 2 α einherging. Daher vermuteten die Autoren, dass durch die Behandlung mit Bockshornkleesamenextrakt die Bildung dieser Substanzen unterdrückt wird oder es zu einer antagonisierenden Wirkung kommt. Die Autoren vermuteten zudem, dass der Bockshornkleesamenextrakt eine zentral vermittelte analgetische Wirkung hat (Vyas et al. 2008).

Um die antioxidativen Effekte von Bockshornkleesamen zu testen, wurden in einer Studie verschiedene Konzentrationen eines wässrigen Extraktes genutzt. Mittels eines FRAP-Assays (ferric reducing ability of plasma), des Ferrylmyoglobin/ABTS-Tests sowie eines DPPH-scavenging-Tests (Diphenylpicrylhydrazyl) wurde die antioxidative Aktivität ermittelt, die mit der Konzentration des Extraktes korrelierte. In diesem Versuch wurde auch der Flavonoidgehalt des wässrigen Bockshornkleextraktes sowie von einem wässrigen, abgekochten Extrakt gemessen. Die Extrakte hatten einen Quercetinäquivalentgehalt von 19 mg bzw. 18 mg pro Gramm. Die Autoren gehen aufgrund des hohen Gehalts davon aus, dass die antioxidative Aktivität der Bockshornkleesamen auf der Flavonoidkomponente beruht (Dixit et al. 2005).

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von Bockshornkleesamen auf das Immunsystem von Mäusen getestet. Dazu wurden drei verschiedene Konzentrationen (50 - 250 mg/kg Körpermasse) eines Bockshornkleesamenextraktes verfüttert. Es konnte eine Erhöhung der humoralen Immunantwort, eine erhöhte zellvermittelte Immunantwort und eine erhöhte phagozytische Kapazität beobachtet werden. Unter Einbeziehung vorangegangener Studien vermuteten die Autoren, dass es sich bei den verantwortlichen Komponenten vermutlich um Saponine, Flavonoide und Faserkomponenten handelt (Bin-Hafeez et al. 2003).

Um mögliche antimikrobielle Effekte (Al-Habori und Roman 2002; Abbas) zu überprüfen, wurden in einer Studie Extrakte von Blättern und Samen von 75 verschiedenen Bockshornkleepflanzen aus unterschiedlichen geografischen Regionen getestet. In diesem Versuch wurden sowohl wässrige als auch Ethanolextrakte angefertigt und deren Einflüsse auf das Wachstum von verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen sowie verschiedenen Hefespezies getestet. Keiner der 75 Pflanzenextrakte zeigte eine antimikrobielle Aktivität (Thomas et al. 2006).

Eine weitere Studie untersuchte die möglichen modifizierenden Einflüsse von 18 verschiedenen Pflanzen aus Jordanien auf die Antibiotikaresistenz eines *Escherichia coli*-Stammes. Dazu wurden die Einflüsse der Pflanzenextrakte im Zusammenwirken mit verschiedenen Antibiotika auf das Wachstum eines antibiotikaresistenten *E.coli*-Stammes getestet. Die Konzentration der Pflanzenextrakte betrug 200 μ g/ml, die der Antibiotika betrug die Hälfte der minimalen Hemmkonzentration (MIC). Bei diesem Versuch zeigte sich, dass der Extrakt aus Bockshornklee das Wachstum des resistenten *E. coli*-Stammes im Zusammenwirken mit

Doxycyclin bzw. Chloramphenicol um 44,5 % bzw. 11,1 % hemmen konnte (Darwish und Aburjai 2010).

In einem Versuch mit Bockshornkleesamen zur Bindungskapazität gegenüber einem enteropathogenen *E. coli*-Stamm konnte eine Reduktion der Bindung von *E. coli*-Bakterien um mehr als 50 % beobachtet werden (Gärtner 2011). Da es sich hier um *in vitro*-Versuche handelte, ist es von Interesse, diese Ergebnisse *in vivo* zu überprüfen.

Die Literatur über Polyphenole als auch über Bockshornkleesamen zeigt die vielfältigen Wirkungen der verschiedenen Substanzen, die sowohl in der traditionellen Heilkunde als auch in wissenschaftlichen Untersuchungen zum Einsatz kommen. Aufgrund zahlreicher Studien zu glukosesenkenden Wirkungen von Bockshornklee und den Polyphenolen wird das Interesse an diesen Pflanzen und sekundären Pflanzenmetaboliten in der Humanforschung deutlich. Für die Tierernährung ergeben sich andere Gründe für den Einsatz dieser phyto-genen Futterzusatzstoffe, nicht nur wegen des Verbots antibiotischer Leistungsförderer, sondern auch wegen des wachsenden Interesses an natürlichen Zusatzstoffen für die Tier- und damit auch Lebensmittelproduktion. Bisher gibt es sehr wenige Fütterungsversuche mit Flavonoiden und Bockshornkleesamen mit Schweinen. Ebenfalls sind *in vitro*-Ergebnisse kaum *in vivo* überprüft worden.

2.4. Ziel der Arbeit

Phytogene Futterzusatzstoffe erlangen eine immer größere Bedeutung in der Ernährung von Schweinen, einerseits, um krankheitsbedingte Verluste zu minimieren und andererseits, um die Leistung zu verbessern. Besonders seit dem Verbot der antibiotischen Leistungsförderer wird verstärkt nach Alternativen gesucht. In den bereits genannten Studien wurde die antioxidative sowie antimikrobielle Wirkung verschiedener Polyphenole nachgewiesen. Bockshornkleesamen haben zum einen antiadhäsive Wirkungen gegenüber *E. coli* als auch einen Einfluss auf die Darmgesundheit. Im Zuge dessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss phyto-gener Substanzen auf die Adhäsion zwischen einem enteropathogenen *Escherichia coli*-Stamm und einer IPEC-J2-Zelllinie getestet. Weiterhin wurde die Wirkung der phyto-genen Futterzusatzstoffe Fresta F[®], Bockshornkleesamen und des polyphenolreichen Apfelextrakts auf die Nährstoffverdaulichkeit bei Absetzferkeln gemessen sowie deren Einfluss auf die Aktivität ausgewählter intestinaler Enzyme und des natriumabhängigen Glukosetransporters SGLT-1 überprüft.

3. Material und Methoden

3.1. In vitro-Versuche

Um mögliche antiadhäsive Effekte der phyto-genen Futterzusatzstoffe zwischen einem entero-pathogenen *Escherichia coli*-Stamm und einer intestinalen Epithelzelllinie zu charakterisie-ren, wurden die folgend dargestellten *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt.

3.1.1. Testmaterialien

Insgesamt wurden sieben verschiedene Substanzen im Hinblick auf ihre möglichen Effekte zwischen einem *E. coli*-Stamm und einer Versuchszelllinie getestet. In der Tabelle 3.1 ist eine Auflistung der getesteten Substanzen zu finden.

Tabelle 3.1: Substanzen, die in den *in vitro*-Versuchen eingesetzt wurden

Substanz	Zur Verfügung gestellt von
Fresta F [®] (phyto-genes Futteradditiv)	Delacon
Bockshornkleesamen	Delacon
Polyphenolreicher Apfelextrakt 1	Delacon
Polyphenolreicher Apfelextrakt 2	Delacon
Pektin	Delacon
Glucoraphanin	MLU Halle
Sulforaphan	MLU Halle

Die fünf von der Firma DELACON Biotechnik GmbH (Steyregg, Österreich) zur Verfügung gestellten Substanzen lagen in pulverisierter Form vor. Die beiden weiteren Substanzen, Sulforaphan und Glucoraphanin, wurden vom Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften (Naturwissenschaftliche Fakultät III, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Das Sulforaphan lag als Reinsubstanz in flüssiger Form vor. Das Glucoraphanin (10 mmol/l) lag in 70%igem Ethanol in flüssiger Form vor.

Fresta F[®] ist ein kommerzielles Präparat, welches ätherische Öle und verschiedene Kräuter enthält. Die beiden Apfelextrakte bestehen zu 75 % aus Polyphenolen und unterscheiden sich geringfügig in der Zusammensetzung der einzelnen Polyphenole.

Zur Herstellung der Extrakte von Fresta F[®] und Bockshornkleesamen wurden jeweils 1 g des Pulvers mit 99 ml Zellnährmedium, welches zusätzlich 10 % Schweineserum enthielt, für 30 min auf dem Magnetrührer verrührt. Anschließend wurden die Lösungen bei 10.000 x g und 15 °C für 15 min zentrifugiert (Ultrazentrifuge Avanti[®] J26xp, Krefeld). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit einem Membranfilter der Porengröße 0,2 µm (Steriler Spritzen-Vorsatzfilter, Firma VWR International, Darmstadt, Deutschland) in ein 50-ml-Greiner-Röhrchen (CELLSTAR[®] PP test tubes, Firma Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) steril filtriert. Zur Herstellung des Pektinextraktes wurden 0,5 g des Pulvers in 99 ml Zell-nährmedium, welches ebenfalls 10 % Schweineserum enthielt, gelöst und anschließend nach oben beschriebenen Schritten weiterverfahren. Nach der Sterilfiltration wurden Verdün-nungsreihen nach dem folgenden Pipettierschema in Tabelle 3.2 angefertigt.

Material und Methoden

Tabelle 3.2: Verdünnungsschema der Testsubstanzen Fresta F[®], Bockhornkleesamen und Pektin

Substanz	Verdünnungen				
	1	2	3	4	5
Fresta F [®]	10 g/l	1 g/l	0,1 g/l	0,01 g/l	0,001 g/l
Bockshornkleesamen	10 g/l	1 g/l	0,1 g/l	0,01 g/l	0,001 g/l
Pektin	1 g/l	0,1 g/l	0,01 g/l	0,001 g/l	0,0001 g/l

Die polyphenolreichen Apfelextrakte wurden ebenfalls in Zellnährmedium gelöst. Anschließend wurden die Verdünnungen bei 1500 x g und 4 °C über 20 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Verdünnungen steril filtriert. Nach der Sterilfiltration wurden die entsprechenden Konzentrationen mit Zellnährmedium hergestellt. Das Glucoraphanin sowie das Sulforaphan wurden ebenfalls mit Zellnährmedium auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Um eine bessere Vergleichbarkeit aller eingesetzten Substanzen zu haben, wurden die Konzentrationen der Apfelextrakte sowie des Sulforaphans und des Glucoraphanins ebenfalls in mg/l umgerechnet. Die nachfolgende Tabelle 3.3 zeigt die angefertigten Verdünnungen der einzelnen Stoffe.

Tabelle 3.3: Getestete Konzentrationen der Apfelextrakte, des Sulforaphans und des Glucoraphanins

Substanz	Verdünnung ¹		
	1	2	3
Apfelextrakt 1	5,5 mg/l ¹	0,27 mg/l ¹	0,14 mg/l ¹
Apfelextrakt 2	5,5 mg/l ¹	0,27 mg/l ¹	0,14 mg/l ¹
Sulforaphan	1,3 mg/l ¹	0,66 mg/l ¹	0,33 mg/l ¹
Glucoraphanin	0,33 mg/l ¹	0,16 mg/l ¹	0,082 mg/l ¹

¹Die Berechnung erfolgte zuerst aufgrund der Molmasse in µM und wurde anschließend in mg/l umgerechnet

3.1.2. Versuchszelllinie

Als Versuchszelllinie wurde eine IPEC-J2 (Intestinal Porcine Epithelial Cells - Jejunal 2) Zelllinie genutzt. Hierbei handelte es sich um eine nicht-transformierte jejunale Epithelzelllinie neugeborener, nicht gesäugter Ferkel (Berschneider 1989). Die Zellen wurden nach der Lagerung bei -80 °C aufgetaut und in Zellkulturflaschen (Cellstar® Tissue Culture Flasks, Firma Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) in das Zellnährmedium überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C in 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert und bis zur Ausbildung eines gleichmäßigen Monolayers mehrfach passagiert.

Versuchsdurchführung

Zwei Tage vor der Infektion wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen mit 1,5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung behandelt und für 15 Minuten bei 37 °C in 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurde durch leichtes Klopfen und Schwenken überprüft, ob sich die Zellen gelöst haben. Anschließend wurden die gelösten Zellen mit 10 ml Nährmedium mittels einer sterilen Pipette (Serologische Pipette CELLSTAR®, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) in ein 50-ml-Greiner-Röhrchen überführt. Dieses wurde dann 10 min bei 289 x g und 16 °C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Hanau). Nach der Zentrifugation wurde das Zellsediment in 10 ml Zellenährmedium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Für die nachfolgende Zellzählung wurden 10 µl von der Zellsuspension abgenommen und mit 90 µl Trypanblau vermischt, sodass eine Verdünnung von 1:10 vorlag. In eine modifizierte Neubauer-Zählkammer (ROTH AG, Karlsruhe, Deutschland) wurden nun 10 µl der Verdünnungslösung gegeben und die Zellen bei einer 40-fachen Vergrößerung gezählt. Für die Zellzählung wurden insgesamt viermal 16 Einzelquadrate ausgezählt. Anhand dieser gezählten Zellen wurde die Zelldichte mit der nachfolgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zelldichte}}{10 \text{ ml}} = \text{Mittelwert der gezählten Zellen} \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10^4$$

10 = Ausgangsvolumen der Zellsuspension in ml

10 = Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer

10⁴ = Verdünnungsstufe der Trypanblaulösung

Nach Berechnung der Zelldichte wurde die benötigte Menge der Zellsuspension berechnet. Für die Versuche wurde eine Zelldichte von 10⁵/ml benötigt. Die entsprechende Menge der Zellsuspension wurde mit einem mit 1 % Penicillin-Streptomycin angereicherten Zellenährmedium aufgefüllt. Anschließend wurde jeweils 1 ml der aufbereiteten Zellsuspension in je eine Kavität einer 24er-Zellkulturplatte (CELLSTAR® 24 Well Cell Culture Plate sterile, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert und für 24 Stunden bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Material und Methoden

Nach dieser Inkubation wurden die Zellen mit den hergestellten Extrakten behandelt. Dazu wurde das Nährmedium aus allen Kavitäten abgesaugt und jeweils 1 ml der Verdünnungslösungen pro Vertiefung, nach dem Schema aus Tabelle 3.4, hinzu pipettiert.

Tabelle 3.4: Pipettierschema der mit Testsubstanzen behandelten IPEC-J2-Zellen auf einer 24er-Zellkulturplatte

NM	V 1	V 2	V 3	V 4	V 5
NM	V 1	V 2	V 3	V 4	V 5
NM	V 1	V 2	V 3	V 4	V 5
NM	V 1	V 2	V 3	V 4	V 5

NM = Nährmedium; V = Verdünnung

Anschließend mussten die Zellen für weitere 24 Stunden bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubieren. Nach Ablauf der erneuten Inkubation wurden die Kavitäten wieder abgesaugt und mit je 200 µl der Verdünnungslösungen bzw. des Nährmediums gefüllt. Bis zur Infektion der Zellen verblieben diese im Inkubator.

3.1.3. Bakterienstamm

Der *Escherichia coli*-Stamm Abbotstown (O149:K91:K88ac), ein enteropathogener Bakterienstamm (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin) wurde zuerst auf einem LB-Agar angezüchtet. Anschließend wurden die Bakterien in ein LB-Medium überimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm für 12 Stunden inkubiert.

3.1.4. Versuchsablauf

Bis zum Versuchsbeginn wurden die Bakterien zweimal täglich überimpft und bis zur nächsten Überimpfung in den Schüttelinkubator verbracht. Dieses mehrfache Überimpfen sorgte für ein besseres Bakterienwachstum. Am Tag der Infektion wurden die Bakterien zuerst an-

Material und Methoden

gefärbt. Dazu wurden 6 ml der Bakteriensuspension in 2-ml-Eppendorf Gefäße (Reaction tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verteilt und mit 13.000 x g bei 4 °C für drei Minuten zentrifugiert. Von der übrig gebliebenen Bakteriensuspension wurden 5 µl in 10 ml LB-Medium überführt und für den nächsten Versuchstag im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 2 ml PBS resuspendiert, um dann erneut zentrifugiert zu werden. Nach der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und das Sediment mit 1 ml PBS resuspendiert. Ein ml der Bakteriensuspension wurde in ein 50-ml-Greiner-Röhrchen pipettiert, in dem sich bereits 4 ml PBS befanden. 20 µl des Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE wurden mit 380 µl Dimethylsulfoxid verdünnt und vermischt. Von dieser verdünnten Färbelösung wurden 50 µl in das vorbereitete Greinerröhrchen pipettiert, sodass die Bakterien in einer Färbelösung mit einer Konzentration von 50 µM vorlagen.

Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre wurde die Bakterienfärbelösung bei 13.000 x g und 4 °C drei Minuten lang zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS. Dafür wurde zuerst der Überstand verworfen, mit einer sterilen Pipette 2 ml PBS hinzugegeben und resuspendiert. Danach folgte die nächste Zentrifugation. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Sediment lediglich mit 1 ml PBS resuspendiert. In ein Eppendorfgefäß wurden 990 µl PBS pipettiert und 10 µl der Bakteriensuspension hinzugefügt, sodass eine Verdünnung von 1:100 vorlag. Von dieser verdünnten Bakteriensuspension wurden 10 µl in eine Thoma Zählkammer (ROTH AG, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Bei einer 40fachen Vergrößerung erfolgte dann die Zählung der Bakterien unter dem Mikroskop. Es wurden fünf Quadrate mit jeweils 16 Kammern gezählt. Aus dieser Zählung wurde der Mittelwert nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Mittelwert} = \frac{\text{Summe aller gezählten Bakterien}}{80}$$

Der Zellzählung schloss sich die Berechnung der Bakteriendichte anhand folgender Formel an:

$$\frac{\text{Bakteriendichte}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert der gezählten Bakterien} * \frac{1000}{0,0005}$$

1000 = Verdünnungsstufe der Bakteriensuspension

0,0005 = Kammerfaktor der Thoma Zählkammer

Material und Methoden

Anhand der Bakteriendichte wurde die benötigte Menge der Bakteriensuspension für eine Zelldichte von 10^7 /ml berechnet. Die entsprechende Menge der Bakterien wurde dann in die vorbereiteten Versuchslösungen pipettiert. Zu den bereits mit den Testsubstanzen vorbehandelten Zellen wurden je 500 μ l dieser Lösungen pro Kavität nach nachfolgendem Schema in Tabelle 3.5 hinzupipettiert.

Tabelle 3.5: Pipettierschema der mit Testsubstanzen behandelten IPEC-J2-Zellen auf einer 24er-Zellkulturplatte für die Infektion mit *E. coli*

NM + <i>E. coli</i>	V 1 + <i>E. coli</i>	V 2 + <i>E. coli</i>	V 3 + <i>E. coli</i>	V 4 + <i>E. coli</i>	V 5 + <i>E. coli</i>
NM + <i>E. coli</i>	V 1 + <i>E. coli</i>	V 2 + <i>E. coli</i>	V 3 + <i>E. coli</i>	V 4 + <i>E. coli</i>	V 5 + <i>E. coli</i>
NM + <i>E. coli</i>	V 1 + <i>E. coli</i>	V 2 + <i>E. coli</i>	V 3 + <i>E. coli</i>	V 4 + <i>E. coli</i>	V 5 + <i>E. coli</i>
NM	V 1	V 2	V 3	V 4	V 5

NM = Nährmedium; V = Verdünnung

Diese Monolayer wurden dann erneut für 90 Minuten bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Monolayer dreimal mit PBS gewaschen. Nach den Waschungen wurden in jede Kavität 20 μ l einer Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben. Die Zellkulturplatte wurde dann für fünf Minuten bei 37 °C in 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurde in jede Kavität jeweils 1 ml eines antibiotikafreien Zellnährmediums hinzugefügt. Mit einer Pipette wurde dann der Inhalt jeder Kavität in jeweils ein FACS-Röhrchen überführt. Diese FACS-Röhrchen wurden anschließend bei 1500 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit 200 μ l Zellnährmedium resuspendiert. Danach erfolgte die Messung am Durchflusssystem.

3.1.5. Durchflusssystem

Die Durchflusssystem ist ein Messverfahren zur Analyse und Zählung von Zellen, die einzeln einen Laserstrahl passieren. Das von den Zellen gestreute Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wird durch einen Detektor gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) hängt von der Größe der Zelle ab. Da die Menge des gestreuten Lichts proportional zur Größe der Zelle ist, verursachen kleine Zellen ein kleines, große Zellen ein großes Streulicht.

Material und Methoden

Das Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter) hängt zusätzlich zur Größe der Zelle auch von ihrer Granularität ab. Auch hier ist die Menge des gestreuten Lichts wieder proportional zur Größe der Zelle und zu ihrer Granularität. Diese Messgrößen geben Aufschluss über die Morphologie der Zellen.

Eine spezielle Form der Durchflusszytometrie ist das Messen von Fluoreszenzlicht. Dadurch ist es möglich, Zellen auf bestimmte Merkmale hin zu untersuchen. Dafür muss die Zelle zuerst mit einem Antikörper, der gegen das zu untersuchende Merkmal gerichtet ist, markiert werden. Dieser Antikörper muss mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt sein. Werden die Antikörper dann mit den Zellen zusammengebracht, binden die Antikörper an die Zellen mit dem entsprechenden Merkmal und sind dadurch markiert. Es ist allerdings auch möglich, Bakterien anzufärben, welche die zu untersuchenden Zellen infizieren, die damit dann je nach Infektionsstatus fluoreszieren.

Für die *in vitro*-Untersuchungen wurden die in Tabelle 3.6 aufgeführten Chemikalien und Geräte verwendet.

Tabelle 3.6: Eingesetzte Chemikalien und Geräte für die *in vitro*-Untersuchungen

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Land
PBS Dulbecco, low endotoxin (Phosphate Buffer Saline), 9,55g/l	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Trypanblau 0,5 % (w/v)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Zellnährmedium DMEM/Ham's F-12 (1:1)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid) HYBRI-MAX®	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (1000Units/ml / 1000µg/ml)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Porcines Serum	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester)	FLUKA	Steinheim, Deutschland
Ultrazentrifuge Avanti® J-26xp	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus	Hanau, Deutschland
Mikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
FACS Clean	Becton Dickinson Biosciences	Heidelberg, Deutschland
FACS Flow™	Becton Dickinson Biosciences	Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	Becton Dickinson Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG® RH	Jahnke& Kunkel IKA-Labortechnik	Staufen, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACS Calibur	Becton Dickinson Biosciences	Heidelberg, Deutschland

3.2. Fütterungsversuch

Versuchsaufbau und -durchführung

Im Rahmen der Studie zum Einfluss phytogener Futterzusatzstoffe bei Absetzferkeln (Reg 0261/11 LaGeSo, Berlin) wurden in zwei Versuchsdurchgängen jeweils 24 Ferkel (12 männliche, 12 weibliche) im Alter von 28 Tagen auf vier Gruppen (A - D) gleichmäßig verteilt, so dass jede Gruppe ein vergleichbares Einstallgewicht hatte. Der Fütterungsversuch lief über einen Zeitraum von vier Wochen. Bei der Einstellung wurden die Tiere gewogen. Die Überprüfung der Körpermasse sowie des Gesundheitsstatus wurde einmal wöchentlich wiederholt. Zur Überprüfung der Verdaulichkeit wurde den Tieren in der letzten Versuchswoche Tiandioxid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) über das Futter verabreicht. An den Tagen 28 - 30 wurden die Tiere zur Probenentnahme euthanasiert.

3.2.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 48 Ferkel (Landrasse x Piétrain) im Alter von 28 Tagen eingesetzt.

Die Ferkel wurden in einem voll klimatisierten Stall mit Flatdecks auf Vollspaltenboden gehalten. Pro Flatdeck waren jeweils zwei Ferkel (1 männliches, 1 weibliches) untergebracht. Zu Beginn des Versuchs war die Temperatur im Stall auf 27 °C eingestellt und wurde bis zum Ende stufenweise auf 24 °C abgesenkt. Während der gesamten Versuchsdauer hatten die Tiere die Möglichkeit, Wasser *ad libitum* über Nippeltränken aufzunehmen. Ein Lichtprogramm sorgte für eine 16-stündige Licht- und eine achtstündige Dunkelphase. In jedem Flatdeck stand den Ferkeln ein Plastikball als Beschäftigung zur Verfügung.

3.2.2. Versuchsfutter und Fütterung

Die Zusammensetzung und Mischung der Versuchsdiet wurde am Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin, erstellt. Die Berechnung der Nährstoffzusammensetzung erfolgte nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2006). Eine Übersicht über die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 3.7 zu finden.

Material und Methoden

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Ferkeldiäten

Futtermittel	Versuchsgruppe			
	A	B	C	D
	%			
Weizen	37,8	37,8	37,8	37,8
Gerste	30,0	30,0	30,0	30,0
Sojaextraktionsschrot	23,5	23,5	23,5	23,5
Maisschrot	1,0	1,0	1,0	1,0
Kohlensaurer Futterkalk	2,0	2,0	2,0	2,0
Sojaöl	1,5	1,5	1,5	1,5
Monocalciumphosphat	2,0	2,0	2,0	2,0
Viehsalz	0,15	0,15	0,15	0,15
Lysin	0,25	0,25	0,25	0,25
Methionin	0,1	0,1	0,1	0,1
Vitamin-Mineral-Prämix*	1,5	1,5	1,5	1,5
Trägerstoff (Weizenkleie)	0,2			
Bockshornkleesamen	-	0,2		-
Fresta F®	-		0,2	-
Apfelextrakt	-	-	-	0,2

*Zusammensetzung pro kg Premix (Spezialfutter Neuruppin Ltd. Neuruppin, Deutschland): 130 g Natrium (als Natriumchlorid); 55 g Magnesium (als Magnesiumoxid); 700.000 UI Vitamin A; 120.000 IU Vitamin D3; 1000 mg Vitamin E (α -Tocopherol); 300 mg Vitamin K; 250 mg Thiamin; 250 mg Riboflavin; 400 mg Pyridoxin; 2000 μ g Cobalamin; 2500 μ g Nikotinsäure; 100 mg Folsäure; 250000 μ g Biotin; 1000 mg Pantothenensäure; 80000 mg Cholinchlorid; 5000 mg Eisen (als Eisen-(II)-Carbonat); 1000 mg Kupfer (als Kupfer-(II)-Sulfat); 5000 mg Zink (als Zinkoxid); 6000 mg Mangan (als Mangan-(II)-Oxid); 45 mg Jod (als Kalziumjodat); 35 mg Selen (als Natriumsele-nit)

Die Menge der zugesetzten phylogenen Futterzusatzstoffe wurde von der Weizenmenge subtrahiert. Die Versuchsgruppe A bekam einen Trägerstoff (Weizenkleie). Der Gruppe B wurde zusätzlich Bockshornkleesamen, der Gruppe C Fresta F® und der Gruppe D ein polyphenolreicher Apfelextrakt verabreicht. Der Apfelextrakt stimmt mit dem Apfelextrakt 1, welcher in den *in vitro*-Untersuchungen getestet wurde, überein. Die Fütterung erfolgte *ad libitum*.

In der vierten Versuchswoche wurde allen vier Gruppen 0,5 % Titandioxid als unverdaulicher Marker zur Diät zugesetzt.

Die Überprüfung der Einmischgenauigkeit der Testsubstanzen auf Menge und gleichmäßige Verteilung in den Versuchsdiäten erfolgte bei der Firma DELACON Biotechnik GmbH (Steyregg, Österreich).

3.2.3. Leistungsparameter

Der Gesundheitszustand wurde täglich beurteilt und protokolliert.

Die Tiere wurden vor der Einstellung, einmal wöchentlich sowie am Tag der Tötung gewogen. Anhand dieser Daten und der Lebendmassedaten wurde die Lebendmassezunahme errechnet.

Die Futterraufnahme wurde rechnerisch für jede Bucht berechnet. Dafür wurde die Futtereinnahme und Rückwaage wöchentlich ermittelt und die Differenz errechnet sowie die Futterverluste in den Auffangbehältern unter den Trögen mit einbezogen.

Der Futteraufwand wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Futteraufwand} = \frac{\text{mittlere Futterraufnahme in kg}}{\text{Lebendmassezunahme in kg}}$$

3.2.4. Probengewinnung

Die Ferkel wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen getötet, sodass jeweils sechs Tiere pro Tag euthanasiert wurden. Die letzte Fütterung fand 3,5 Stunden vor der Tötung statt, sodass eine ausreichende und vergleichbare Darmfüllung gegeben war. Vor der Tötung wurden die Ferkel mit 0,25 ml/kg KGW Ketamin (Ursotamin[®], 10 %ig, Serumwerk Bernburg AG, Deutschland) und 0,1 ml/kg KGW Azaperon (Stresnil[®], Jansen-Cilag, Neuss, Deutschland) intramuskulär in die lange Sitzbeinmuskulatur narkotisiert. Um die gewünschte Tiefe des Narkosestadiums zu überprüfen, wurden die Lid- und Zwischenklauenreflexe getestet. Vor der Euthanasie wurde den Tieren intrakardial 10 ml Blut entnommen. Anschließend wurden die Tiere intrakardial mit einem Kombinationspräparat bestehend aus Embutramid, Mebezoniumiodid und Tetracainhydrochlorid (T61[®] Firma Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) in einer Dosierung von 0,5 ml/kg KGW euthanasiert.

Nach der erfolgreichen Tötung der Tiere wurde die Bauchhöhle durch einen Schnitt entlang der Linea alba sowie zwei Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens eröffnet. Dann erfolgten die Entnahme von Harn aus der Blase und die Entnahme von Kot aus dem Rektum. Anschließend wurde das Darmkonvolut entnommen, der Dünndarm vollständig vom Dickdarm gelöst und auf dem Tisch ausgebreitet. Aus dem mittleren Jejunum wurde ein 100 cm langes Stück entnommen und in einer 85%igen NaCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) auf Eis gestellt. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen in der Ussingkammer wurde ein weiteres, 30 cm langes, Stück des Jejunums entnommen und in Krebs-Henseleit-Puffer gegeben. Für die Analyse der RNA-Expression wurde ein weiteres vier cm langes Stück des Jejunums entnommen und sofort kryokonserviert. Das Ileum wurde definiert, als

distaler 100 cm langer Teil des Dünndarms. Die letzten zwei Zentimeter wurden dabei ausgespart. Die gesamte Digesta aus dem Ileum wurde entnommen und auf Eis gestellt. Der pH-Wert der Kot- und Ileumproben sowie der entnommenen Urinproben wurde direkt bestimmt.

3.2.5. Futtermittelanalyse

Die Rohnährstoffe der eingesetzten Futtermittel wurde nach der Weender Futtermittelanalyse nach Empfehlungen der VDLUFA, Methodenbuch III (Naumann und Bassler 2004) bestimmt.

3.2.5.1. Rohnährstoffe

Trockensubstanz (TS)

Um die Trockensubstanz zu bestimmen, wurden in einen Porzellantiegel 2 g der Futtermittelproben eingewogen und bei 103 °C vier Stunden lang getrocknet. Anschließend wurde das Probenmaterial im Exsikkator bis zum Erlangen der Raumtemperatur abgekühlt und wieder gewogen. Die Trockensubstanz wurde dann rechnerisch ermittelt.

Rohasche (Ra)

Um die Rohasche zu ermitteln, wurde 1 g der Futtermittelproben eingewogen und im Muffelofen bei 600 °C verascht. Nachdem die Proben im Exsikkator auf Raumtemperatur abkühlten, wurden sie erneut gewogen.

Rohprotein (Rp)

Zur Rohproteinbestimmung wurde der Stickstoffgehalt der Futtermittelproben durch einen Makro-Elementaranalysator gemessen.

Rohfett (Rfe)

Um den Rohfettgehalt zu bestimmen, wurde das Fett aus den Futtermittelproben mit Petroläther drei Stunden in einem Soxhlet-Apparat extrahiert. Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdampft war, wurden die Proben gewogen und der Rohfettgehalt rechnerisch ermittelt.

Rohfaser (Rfa)

Der Rohfasergehalt wurde durch einen Rohfaseranalysator ermittelt. Dazu wurden die Futtermittelproben erst in 1,25 %iger Schwefelsäure und anschließend in 1,25 %iger Natronlauge gekocht. Die Glasfiltertiegel wurden aus dem Analysator entnommen und in den Trockenschrank verbracht, wo sie bei 105 °C trockneten. Danach wurden sie gewogen und bei 500 °C im Muffelofen verascht. Durch Subtraktion des Gewichtes der Rohasche vom Gewicht des getrockneten Inhalts der Glasfiltertiegel wurde der Rohfasergehalt errechnet.

Stärke

Der Stärkegehalt wurde mithilfe eines enzymatischen UV-Tests ermittelt. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der enzymatischen Spaltung von Stärke zu D-Glucose. Aus der D-Glucose entsteht durch weitere enzymatische Reaktionen NADPH, welches proportional zur Menge der D-Glucose ist, die aus der Hydrolyse der Stärke entstanden ist. Anschließend wurde NADPH fotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt.

3.2.5.2. Mineralstoffe und Spurenelemente

Probenvorbereitung

Im Anschluss an die Veraschung wurden den Futterproben 20 ml destilliertes Wasser und 6 ml Salzsäure (36-38 %) zugesetzt. Danach wurden die Proben für 50 min bei 250 °C im Sandbad erhitzt. Anschließend wurden die Proben mittels eines Faltenfilters filtriert und mit 50 ml Reinstwasser aufgefüllt.

Kalzium, Magnesium, Natrium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen

Die Gehalte der Mineralstoffe Kalzium, Magnesium, Natrium, Kalium, Zink und Eisen wurden durch Flammen-Atomabsorptionsspektrofotometrie in der Aschelösung ermittelt. Dafür wurde zuerst für jede Substanz eine Kalibrierreihe erstellt und die jeweiligen Proben 1:20 verdünnt im Flammen-Atomabsorptionsspektrofotometer gemessen.

Phosphor

Der Phosphorgehalt in den Futtermittelproben wurde mittels der colorimetrischen Bestimmung mit Vanadat-Molybdat bestimmt. Dafür wurden 500 µl der vorbereiteten Aschelösung mit 5 ml einer Lösung, welche aus Salpetersäure (134 ml; 65%ig) sowie den

P-Komplexbildnern Ammoniumvanadat (200 ml) und Ammoniummolybdat (200 ml) bestand, versetzt. Die Proben wurden mit destilliertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Der in der Probe enthaltene Phosphor reagierte in dem salpetersauren Milieu zu einem gelben Farbkomplex, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 436 nm fotometrisch gemessen wurde. Mithilfe der Eichkurve konnte anschließend der Phosphorgehalt bestimmt werden (Gericke und Kurmies 1952).

3.2.5.3. Bestimmung des α -Tocopherol-Gehalts

Die Vitamin E-Bestimmung in den Futtermitteln wurde im Institut für physiologische Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt. Bei der Untersuchung wurde der Gehalt an α -Tocopherol bestimmt.

3.2.5.4. Bestimmung der Aminosäuren

Probenvorbereitung

Zuerst werden jeweils 500 mg der gemahlenden Futterproben in eine 50-ml-Pyrex-Glasflasche eingewogen.

Hydrolyse

Jeweils 25 ml Hydrolysemischung (6 molare Salzsäure) wurden den Proben hinzugegeben. Die Glasflaschen wurden mit nur aufgelegten Deckeln bei 110 °C 1h lang in einen Trockenschrank gestellt, damit das entstehende Chlorgas entweichen konnte. Nach 60 Minuten wurden die Deckel zugeschraubt und die Proben verblieben für weitere 23 Stunden bei 110 °C im Trockenschrank. Nach Entnahme der Proben wurden diese sofort in ein Eisbad gestellt. Unter Rühren wurde den Lösungen 7,05 molare Natronlauge vorsichtig in kleinen Portionen hinzugegeben, ohne dass sich die Lösungen auf über 40 °C erhitzen. Im Anschluss wurden die Lösungen, deren pH-Wert zuvor auf 2,20 eingestellt wurde, quantitativ in einen 100-ml-Messkolben mittels eines Puffers (pH = 2,20). Nach kurzem Aufschütteln wurden die Lösungen membranfiltriert und anschließend der Aminosäuregehalt mittels Ionenaustauscherchromatographie ermittelt.

Bestimmung der Aminosäuren Cystein und Methionin

Der Probenaufbereitung zur Bestimmung der Gehalte der Aminosäuren Cystein und Methionin wurde eine Oxidation vorangestellt. Dazu wurden ebenfalls 500 mg des gemahlenden Probenmaterials in eine 50-ml-Pyrex-Glasflasche eingewogen.

Oxidation

Zuerst wurde frische Oxidationslösung hergestellt. Pro Probe wurden jeweils 0,5 ml H₂O₂ (30%ig) und 4,5 ml Ameisensäure (88%ig) vermischt und 60 Minuten bei 36 °C ins Wasserbad gestellt. Anschließend wurde die Oxidationslösung für 5 Minuten ins Eisbad gestellt und dann sofort verwendet. Jeweils 5 ml der Oxidationslösung wurden auf jede Probe gegeben und die danach geschwenkt, damit die ganze Probe benetzt war. Die Proben wurden dann in einem Eisbad für 24 Stunden bei 0 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Nach diesen 24 Stunden wurde die Oxidation durch Zugabe von je 0,9 g Natriumdisulfit abgebrochen, sodass die oben beschriebene Hydrolyse erfolgen konnte.

Messung des Aminosäuregehalts

Die Bestimmung des Aminosäuregehalts erfolgte mittels der zuvor aufbereiteten Proben, welche anschließend in einem automatischen Aminosäurenanalysegerät (Biochrom 20+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gemessen wurden.

Die für die Futtermitteluntersuchung eingesetzten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Material und Methoden

Tabelle 3.8: Eingesetzte Geräte und Chemikalien bei der Futtermitteluntersuchung

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Land
Exsikkator Typ Novus NS 24/29	Schott/Duran	Mainz, Deutschland
Photometer: Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Rohfaser-Analysator Ankom ²⁰⁰⁰ Fibre Analyser	Ankom Technology	Macedon, USA
Heraeus [®] Trockenschrank T5042	Heraeus electronic	Hanau, Deutschland
Zentrifugalmühle, ZM 100	Retsch GmbH	Haan, Deutschland
Analysewaage Typ Genius	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Atomabsorptionsspektrometer vario 6	Analytik Jena GmbH	Jena, Deutschland
XT4 Filter Bags	Ankom Technology	Macedon, USA
F57 Filter Bags	Ankom Technology	Macedon, USA
Schwefelsäure (98 %) Qualität	J. T. Baker	Griesheim, Deutschland
Salpetersäure (65 %) Qualität	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (37 %)	J. T. Baker	Griesheim, Deutschland
Makroelementaranalysator vario max CN	Elementar Analysensystem GmbH	Hanau, Deutschland
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat >99 % p.a. krist.	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Ammoniummonovanadat zur Analyse	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid ≥99 %	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Muffelofen Heraeus [®] Thermicon®P	Heraeus electronic	Hanau, Deutschland
Petroleumbenzin, reinst	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Aminosäurenanalysegerät Biochrom 20+	Amersham Pharmacia Biotech (GE Healthcare Europe GmbH)	Freiburg, Deutschland
Ameisensäure (88 %)	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natronlauge	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland

3.2.6. Biochemische Methoden

3.2.6.1. Isolierung der Bürstensaummembran

Um die Aktivität von Verdauungsenzymen zu bestimmen, die sich im apikalen Bereich der Bürstensaummembran befinden, war es notwendig, die Bürstensaummembran vorher zu isolieren.

Zur Vorbereitung für die Isolierung der Bürstensaummembran wurde das 100 cm lange Jejunumgewebestück zunächst mehrfach mit eiskalter NaCl-PMSF-Lösung durchgespült und die ganze Zeit auf Eis gekühlt. Anschließend wurden alle Peyerschen Plaques entfernt, der Darm in der Länge aufgeschnitten und auf einer eisgekühlten Unterlage ausgebreitet. Mittels eines Objektträgers wurde die Mukosa abgeschabt und in ein 50-ml-Greiner-Röhrchen gegeben. Anschließend wurden 30 ml Präparationspuffer sowie 80 µl PMSF hinzupipettiert und die Mukosa 30 Sekunden mit dem UltraTurax S 10 auf Eiswasser homogenisiert.

Präparationspuffer:

Tris-HCl	20 mM
EGTA (Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure)	5 mM

Nach fünf Minuten wurde die Mukosa erneut 30 Sekunden lang homogenisiert und anschließend aliquotiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Isolierung der Bürstensaummembran erfolgte nach einer Modifikation der Methode nach Chang et al. (1991). Für die Isolierung der Bürstensaummembran wurden die Mukosahomogenisate langsam aufgetaut und mit 10 ml Präparationspuffer sowie 20 µl PMSF für 30 Sekunden auf Eiswasser homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit jeweils 10 ml Präparationspuffer und 20 µl PMSF in Oakridge-Zentrifugenröhrchen überführt.

Für die erste Präzipitation mit MgSO_4 wurde den Homogenisaten in den Oakridge-Zentrifugenröhrchen unter langsamem Rühren 0,4 ml einer 1,5-molaren Magnesiumsulfatlösung zugegeben. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten mit Hilfe von Magnetrührern weitergerührt. In der Ultrazentrifuge wurden die Proben dann für 15 Minuten bei 4 °C und $10.000 \times g$ zentrifugiert. Danach wurden die Pellets verworfen und der Überstand wurde bei $47.000 \times g$ und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Nach dieser zweiten Zentrifugation wurden die Überstände verworfen. Danach erfolgte die zweite Präzipitation mit MgSO_4 . Dafür wurden die Pellets der zweiten Zentrifugation in jeweils 30 ml Präparationspuffer aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurden die Proben in jeweils 10 ml Präparationspuffer überführt und unter langsamen Rühren mit 0,4 ml einer 1,5-molaren Magnesiumsulfatlösung vermischt. Danach wurden die Proben für 15 Minuten mit Hilfe von Magnetrührern weiterverrührt. In der Ultrazentrifuge wurden die Proben dann für 15 Minuten bei 4 °C und $10.000 \times g$ zentrifugiert. Danach wurden die Pellets verworfen und der Überstand wurde bei $47.000 \times g$ und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Nach dieser vierten Zentrifugation wurden die Überstände verworfen und die Restflüssigkeit vollständig mit Hilfe von Wattestäbchen entfernt. Die entstandenen Pellets aus der letzten Zentrifugation wurden in jeweils 1000 µl Präparationspuffer ohne PMSF aufgenommen und in jeweils zehn 0,2-ml-Eppendorfgefäße zu 100 µl aliquotiert. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

3.2.6.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) basiert auf dem Farbstoff Coomassie-Blau, der sein Absorptionsmaximum durch Bindung an Proteine verändert. Mithilfe einer Standardreihe, die eine definierte Menge an Protein in verschiedenen Konzentrationen enthält, lässt sich die unbekannte Proteinmenge einer Lösung bestimmen.

Die Proteinbestimmung erfolgte aus der zuvor isolierten Bürstensaummembran, welche vorher zu je 100 µl aliquotiert wurden. Jedes 100 µl Probenaliquot wurde mit 1 µl Saponin vorbehandelt, um die Vesikel zu linearisieren. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden die Proben jeweils 1:40, 1:50 und 1:60 mit Tris-HCl (20 mM) vorverdünnt. Eine Standardreihe aus γ-Globulin und Tris-HCl wurde in den Konzentrationen 10 – 250 µg/ml hergestellt. Für die Analyse wurden jeweils 30 µl der Proben bzw. der Standardreihe sowie 300 µl Bradford – Reagenz in eine Mikrotiterplatte pipettiert und diese für eine Minute bei 1050 rpm auf dem BioShaker geschüttelt. Anschließend erfolgte die Messung bei 580 nm und 37 °C über 15 Minuten für jeweils eine Minute.

Aus den Doppelbestimmungen wurden Mittelwerte gebildet. Aus den Extinktionswerten der Standardreihe wurde eine Kalibriergerade erstellt anhand welcher die Proteinwerte der Proben berechnet werden konnten.

3.2.6.3. Bestimmung der Aktivitäten verschiedener intestinaler Enzyme

Die Bestimmung nach Verdauungsenzyme Laktase, Maltase, Saccharase, Aminopeptidase N und der alkalischen Phosphatase erfolgte aus den zuvor isolierten Bürstensaummembranen. Vor jedem Enzymassay wurden die Proben nach dem Auftauen mit 0,005 % Saponin zur Linearisierung der Membranvesikel vorbehandelt. Das Saponin musste jeweils 15 Minuten auf Eis inkubieren, bevor die Proben analysiert werden konnten. Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde als Grundlage sämtlicher Enzymbestimmungen genutzt.

3.2.6.3.1. Bestimmung der Dissacharidaseaktivitäten

Die Aktivität der Enzyme Laktase, Maltase und Saccharase wurde nach der Methode nach Dahlqvist (1968) bestimmt. Die Methode beruht auf der Spaltung von Disaccharasen in Glucose, deren Gehalt durch eine fotometrische Messung bestimmt werden kann. Die Proben werden hierzu mit den Substraten Laktose, Maltose und Saccharose bei 37 °C für 35 Minuten inkubiert. Nach der fünften, 20. und 35. Minute wurden die Reaktionen durch Zugabe von einem ABTS-Farbreagenz gestoppt. Bei dieser Reaktion entsteht ein Farbumschlag, von farblos zu dunkelgrün, durch die Oxidation des ABTS. Der Glukosegehalt kann durch Zugabe der Enzyme Meerrettich-Peroxidase und Glukoseoxidase bei 405 nm fotometrisch bestimmt werden.

3.2.6.3.2. Bestimmung der Aktivität der Aminopeptidase N

Die Aktivität der Aminopeptidase N erfolgte modifiziert nach (Maroux et al. 1973). Als Standardreihe wurde 4 – Nitroanilin in einer Konzentrationsreihe von 6,25 – 200 μM gelöst in 50 mM Tris HCl verwendet. Die Proben wurden auf zwei verschiedene Proteinkonzentrationen verdünnt. Nach der Zugabe des Substrats L–Alanin–4–nitroanilid–Hydrochlorid (10 mM) in Tris HCl (50 mM) wurden die Aktivität der Aminopeptidase N bei 405 nm und 37 °C fotometrisch bestimmt.

3.2.6.3.3. Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase wurde modifiziert nach Lauber und Richter (1966) bestimmt. Hierbei dient p-Nitrophenol in 1,5 molarem 2-Amino-2-Methylpropanol als Standardreihe einer Konzentration von 1 – 150 μM . Die Proben wurden auf zwei verschiedene Proteinkonzentrationen verdünnt und nach Zugabe des Substrats p-Nitrophenolphosphat in ABS (4 mg/ml) bei einer Wellenlänge von 405 nm fotometrisch bestimmt.

3.2.6.4.1. TEAC–Assay

Mit dem TEAC–Assay (trolox equivalent antioxidant capacity) lässt sich die antioxidative Kapazität einer Probe bestimmen (Miller et al. 1996). Die Grundlage des Assays ist die Reaktion zwischen einem 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) – Kation (ABTS⁺⁺) und antioxidativen Substanzen, welche ABTS reduzieren. Durch diese Reduktion wird der blaugrünliche Komplex entfärbt, sodass die Absorptionsabnahme fotometrisch messbar ist. Um etwaige Reaktionen zwischen ABTS und anderen Substanzen zu verhindern, wurde eine Modifikation des Assay durchgeführt (Re et al. 1999). Dabei wurde eine wässrige Lösung aus ABTS und Kaliumperoxodisulfat hergestellt, die über 12 Stunden abgedunkelt inkubierte. Aus dieser Reaktion entstand ein blaugrüner ABTS-Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 734 nm. Als Standard wurde eine Trolox – Lösung verwendet, aus der nach der Messung und abzüglich des Blindwertes, eine Kalibriergerade erstellt wurde. Anhand dieser Kalibriergerade konnte der TEAC – Wert der Plasmaproben bestimmt werden.

3.2.6.4.2. FRAP–Assay

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität ist das Ferric reducing ability of plasma–Assay (FRAP) (Benzie und Strain 1996). Diese Methode beruht auf der Reduzierbarkeit von Eisen-III zu Eisen-II durch Antioxidantien. Durch diese Reduktion entsteht ein blauer Farbkomplex, welcher bei 593 nm fotometrisch bestimmbar ist.

Die für die biochemischen Untersuchungen eingesetzten Chemikalien und Geräte sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Material und Methoden

Tabelle 3.9: Bei den biochemischen Analysen eingesetzte Chemikalien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Land
Tris-HCl	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ultra Turrax® S10	IKA®-Werke	Staufen, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid, 85%	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ultrazentrifuge Avanti® J26xP	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Oakridge-Röhrchen, 50 ml	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliantblau G250	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethanol, 96%	Roth AG	Karlsruhe, Deutschland
Phosphorsäure, 85%	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
γ-Globulin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Mikrotiterplatte, U-Form	Anicrin S.R.L.	Scorze, Italien
Mikrotiterplattenleser BioShake iQ	Tecan GmbH QUANTIFOIL Instruments GmbH	Mainz, Deutschland Jena, Deutschland
Laktose	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Maltose	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium-salz	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Maleinsäure	Roth AG	Karlsruhe, Deutschland
Peroxidase 769 u/ml	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Glucose-Oxidase 100 u/ml	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
2-amino-2-methylpropanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
p-Nitrophenol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
p-Nitrophenolphosphat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
L-Alanin-4-nitroanilid-hydrochlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Nitroanilin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumacetat	Roth AG	Karlsruhe, Deutschland
2,4,6-Tripyridyl-s-triazin (TPTZ)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eisen-III-Chlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Eisen-II-Sulfat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Trolox	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

PBS	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kaliumperoxosulfat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eppendorf Gefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Reinstwasser	Milipore Company	Massachusetts, USA

3.2.6.5 Verdauungsphysiologische Untersuchungen

3.2.6.5.1. Titandioxidbestimmung

Die Verdaulichkeitsbestimmung erfolgte mittels der Indikatormethode. Als Indikator wurde Titandioxid verwendet.

Die Digesta- und Kotproben wurden direkt nach der Probenentnahme bei -20 °C eingefroren und dann in tiefgefrorenem Zustand eingewogen. Nach zwei Tagen in der Vakuumgefrierd Trocknung wurden die Proben erneut gewogen und die Trockensubstanz der Digesta und des Kots rechnerisch ermittelt.

Um die praecaecale und Gesamtverdaulichkeit zu ermitteln, wurden die gefriergetrockneten Proben auf eine Größe von 0,5 mm gemahlen. Anschließend wurden ca. 100 mg der Proben für die Titanoxidbestimmung in einen Glaskolben eingewogen. Den Proben wurden jeweils 10 ml Schwefelsäure, zwei Siedesteinchen und 0,5 Kjeldahltabletten hinzugegeben. Bei 400 °C wurden die Proben 110 Minuten in einem Kjeldahlaufschlussgerät (DigiPrepHT, S-prep GmbH, Überlingen) aufgeschlossen.

Die abgekühlten Proben wurden mittels destillierten Wassers quantitativ in einen Glaskolben überführt und auf 25 ml aufgefüllt. Nach erneuter Abkühlung wurden die Proben durch einen Blauband-Rundfilter in ein 15-ml-Greineröhrchen gefüllt. Aus den aufbereiteten Proben wurde mithilfe der Atomabsorptionsspektrometrie der Titangehalt der Proben bestimmt.

3.2.6.5.2. Rohproteinbestimmung

Die Bestimmung des Rohproteingehaltes in den Ileumdigesta- und Kotproben erfolgte analog zur oben genannten Methode zur Bestimmung des Rohproteins im Futter.

3.2.6.5.3. Bestimmung des Aminosäuregehalts

Die Bestimmung des Aminosäuregehalts in den Digesta- und Kotproben erfolgte nach der gleichen Methode wie die oben Beschriebene zur Bestimmung des Aminosäuregehalts im Futter.

Berechnung der Verdaulichkeiten

Die Berechnung der praecaecalen und Gesamtverdaulichkeit erfolgte über nachfolgende Formel (Angaben in der Trockensubstanz):

$$\text{Verdaulichkeit (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Titangehalt Futter (g/kg)} \cdot \text{Nährstoff Digesta (g/kg)}}{\text{Titangehalt Digesta (g/kg)} \cdot \text{Nährstoff Futter (g/kg)}} \right) \cdot 100$$

3.2.6.6. Elektrophysiologische Untersuchungen des Jejunumgewebes mittels der Ussing-Kammer

Die elektrophysiologischen Messungen am isolierten Jejunumepithel wurden mittels einer modifizierten Ussing-Kammer-Technik nach Ussing und Zerahn (1951) durchgeführt. Nach der Probenentnahme wurde das Gewebestück sofort in einen gekühlten und zuvor mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begasten modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer, dessen Zusammensetzung in Tabelle 3.10 aufgeführt ist, gelegt.

Tabelle 3.10: Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (Osmolarität = 300 mosm/l, pH = 7,4)

Komponenten	Konzentration in mmol/l
CaCl ₂ *2 H ₂ O	1,5
MgCl ₂ *6 H ₂ O	1,2
Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	2,4
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	0,6
NaHCO ₃	25,0
KCl	5,0
NaCl	115,0
Mannitol	20,0

Bevor das Gewebe in die Ussing-Kammer eingespannt wurde, wurde die Mukosa von den serosalen Anteilen des Gewebes getrennt. Das isolierte Epithel wurde anschließend zügig in jeweils sechs Ussing-Kammern mit einer Kontaktfläche von 1,31 cm² eingespannt. Sowohl die mukosale als auch die serosale Seite wurde mit jeweils 15 ml der 38 °C warmen Pufferlösung umspült und kontinuierlich mit Carbogen begast.

Die Ussing-Kammern waren an zwei computerkontrollierte Strom-Spannungsklemmapparaturen (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Deutschland) angeschlossen. Die Messung der transepithelialen Potentialdifferenz erfolgte durch bipolare Stromimpulse von 50 µA über 200 ms und die Gewebeleitfähigkeit (Gt) wurde nach dem Ohm'schen Gesetz berechnet. Nach einer Äquilibrierungsphase von ca. 15 – 30 Minuten wurde der Kurzschlussstrom (I_{sc}) mit einer Stromstärke von 0 mV eingestellt. Nach Erreichen einer Basislinie wurde das Substrat Glucose in einer Konzentration von 10 mmol/l apikal hinzugefügt. Zum Ausgleich der Osmolarität wurde parallel Mannitol in einer Konzentra-

tion von 10 mmol/l auf der serosalen Seite zugesetzt. Sobald Isc konstante Werte erreicht hatte, wurde Phlorizin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ auf der mukosalen Seite hinzugegeben, wodurch der natriumabhängige Glucosetransporter SGLT-1 gehemmt wurde. Nach erneutem Erreichen konstanter Werte wurden der serosalen Seite 100 $\mu\text{mol/l}$ Carbachol zugesetzt. Die basolaterale Applikation von Carbachol führt zu einer Chloridsekretion (Chandan et al. 1991). Diese Messung der Anionensekretion diente zum Vitalitätsnachweis des Gewebes. Sobald es zu keinem weiteren Anstieg des Kurzschlussstroms kam, wurden die Kammer gestoppt.

Die bei den elektrophysiologischen Untersuchungen eingesetzten Chemikalien sind Tabelle 3.11 aufgeführt.

Tabelle 3.11: Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen (Ussingkammer) eingesetzte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Land
Kalziumchloriddihydrat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Magnesiumchloridhexahydrat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Mannitol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Phlorizin	Roth AG	Karlsruhe, Deutschland
Glucose	Merck	Darmstadt, Deutschland
Carbachol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

3.2.7 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.7.1. Bestimmung der Genexpression ausgewählter intestinaler Enzyme

Mithilfe der quantitativen reversen-Transkriptase-PCR ist die Messung der Verteilung eines spezifischen Transkripts im Gewebe möglich. Da die RNA nicht direkt als Template eingesetzt werden kann, wird das Enzym reverse Transkriptase genutzt, welches die vorliegende RNA in cDNA (complementary DNA) umschreibt. In einem zweiten Schritt wird die cDNA mittels der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Durch Zugabe des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR[®]Green, der sich an die DNA bindet, kann die Fluoreszenz in jedem Reaktionsschritt gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität verhält sich direkt proportional zur Menge der gebildeten DNA. Durch diese Information können Rückschlüsse auf die Menge der eingesetzten RNA gezogen werden.

Diese Methode ermöglicht es, auch sehr geringe Mengen an RNA zu quantifizieren.

3.2.7.2. Probenaufbereitung

Die Jejunumproben wurden nach der Probenentnahme sofort kryokonserviert und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 80 °C gelagert. Zur Vorbereitung für die RNA-Extraktion wurde ein jeweils 300 – 400 mg schweres Stück abgetrennt und für mindestens 24 Stunden in der zehnfachen Menge RNA-Later bei – 20 °C gelagert.

3.2.7.3. RNA-Extraktion

Aus den vorbereiteten Jejunumproben wurde die RNA mithilfe des Nucleo Spin[®] RNA II Kit gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert.

3.2.7.4. Bestimmung des RNA-Gehalts und der RNA-Qualität

Die Quantität der extrahierten RNA wurde mittels einer Absorptionsmessung im Bereich zwischen 260 und 280 nm gemessen. Für diese Absorptionsmessung wurde das Spektrometer NanoDrop[®] genutzt.

Anschließend konnte die RNA-Qualität mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit gemäß Herstellerangaben im Agilent 2100 Bioanalyser bestimmt werden.

Für die qRT-PCR wurden die RNA-Proben mit RNase-freiem Wasser auf 100 ng/µl verdünnt.

3.2.7.5. Reverse Transkription

Die reverse Transkription startet mit der Bindung der Primer an die RNA-Matrize. Von den Primern ausgehend startet die reverse Transkriptase die Synthese der einsträngigen DNA (cDNA). Das zweite Enzym, die RNase, ist anschließend für den Abbau der RNA verantwortlich. Als Primer wurden Hexamer-Primer eingesetzt, welche unspezifisch binden.

Je 15 µl der RNA-Proben wurden nach dem Auftauen zuerst mit 2 µl Random-Primer-Mix, 2 µl dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate) und 7 µl Nuclease-freiem Wasser vermischt und für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt. Nach der Kühlung im Eis wurde den Ansätzen sowohl 8 µl reverse Transkriptase Puffer sowie 4 µl Dithiothreitol (0,1 M) hinzugefügt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten wurde den Ansätzen der RT/RNaseblock hinzupipettiert und alles vorsichtig durchmischt. Anschließend erfolgte die reverse Transkription im Sure Cycler bei 42 °C für 60 Minuten, inklusive der Inaktivierung der Enzyme bei 95 °C für fünf Minuten.

3.2.7.6. Amplifikation der cDNA

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit Hilfe des Brilliant II LowRox Mastermix-Kits durchgeführt. Für die Messung der Genexpression der Verdauungsenzyme Laktase, Maltase, Saccharase, der Aminopeptidase N sowie des natriumabhängigen Glucosetransporters SGLT-1 wurden die in Tabelle 3 12 aufgeführten Primerpaare verwendet. Basierend auf ver-

Material und Methoden

Öffentlichen Sequenzen der oben genannten Zielgene beim Schwein wurden die Primer über das Onlinewerkzeug NCBI Primerdesign auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> entwickelt und am Institut für Tierernährung validiert. Als Haushaltsgene wurden Bet2Glob und SGDA eingesetzt. Jeder Ansatz bestand aus 24 µl Mastermix, welcher nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt wurde:

12	µl	Brilliant II LowRox-PCR-Mastermix
0,5	µl	Primer forward (10 µM)
0,5	µl	Primer reverse (10 µM)
11	µl	Nuclease-freies Wasser

Zu diesem Ansatz wurde jeweils 1 µl der Probe hinzugegeben.

Die Amplifikation erfolgte in dem PCR-Gerät Stratagene Mx3000p mit den folgenden Einstellungen:

- 1 Zyklus: Polymerisation bei 95 °C, 10 min
- 40 Zyklen: Denaturierung bei 95 °C, 30 sec
Primer-Hybridisierung (Annealing-Temperatur) s. Tabelle 12, 60 sec
Elongation bei 72 °C, 30 sec

Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte durchgeführt, um spezifische und unspezifische PCR-Produkte und möglicherweise gebildete Primer-Dimere zu unterscheiden. Auf diese Weise ist eine Verifizierung der Spezifität des Tests möglich.

Material und Methoden

Tabelle 3.12: In der qRT-PCR verwendete Primer

Gen	Primersequenz forward	Primersequenz reverse	Annealing-Temperatur in °C
Aminopeptidase N	TGACCACGCAGAGCCCACCT	GGTACACGTTCGCCTGGCACG	60 °C, 59bp
Saccharase	TGGGATCAAACCTTTCTTGGACGCTG	ACTCTTGCCATAAGCAGCCACGT	58 °C, 103bp
Laktase-Phlorizin-Hydrolase	ATACACCCCAGACACGTTGGA	GGTGAGGGACGAGGTTTCAGA	55 °C, 117bp
SGLT-1	AAAGGAGAGGTCTGGGATGGTAA	ATTTCCCTAGTGGCCTGAGATTG	60 °C
		Housekeeper	
Bet2Glob	CCCCGAAGGTTTCAGGTTTAC	CGGCAGCTATACTGATCCAC	60 °C
SDAH	CAAACCTCGCTCCTGGACCTC	CCGGAGGATCTTCTCAAGC	60 °C

3.2.7.7. Auswertung der PCR

Die Auswertung der PCR erfolgte mit dem Softwareprogramm Rest2009 (Pfaffl et al. 2002). Diese Software arbeitet nach einem mathematischen Prinzip, welches die unterschiedlichen PCR-Effizienzen des Zielgens sowie der Referenzgene berücksichtigt.

Mithilfe der Software wird aus den eingegebenen C_T -Werten die relative Expression des entsprechenden Zielgens errechnet. Der C_T -Wert gibt den Zyklus an, in dem ein signifikantes erhöhtes Fluoreszenzmerkmal zum ersten Mal messbar ist.

Bei der Auswertung mit der Software Rest2009 wird die Expression der entsprechenden Gruppe immer mit der Expression der Kontrolle verglichen, sodass man die relative Expression erhält.

Die während der molekularbiologischen Untersuchungen eingesetzten Chemikalien, Geräte sowie die Software sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

Tabelle 3.13: Bei den molekularbiologischen Untersuchungen eingesetzte Chemikalien, Geräte sowie die eingesetzte Software

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Land
RNA ^{later} RNA Stabilization Reagent	Qiagen	Düsseldorf, Deutschland
Nucleo Spin® RNA II Kit	Nucleo Spin, Macherey & Nagel	Düren, Deutschland
NanoDrop® Spektrometer	NanoDrop Technologies, Inc.	Wilmington, DE, USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Real time QPCR System Mx3000P®	Stratagene	Amsterdam, Niederlande
REST2009	Qiagen	Hilden, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries	West Palm Beach, USA
Real Time-PCR-Gefäße	Agilent Technologies	Böblingen, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Rt/RNaseblock Mix	Stratagene	Amsterdam, Niederlande
M-MLV Reverse Transcrip-tase Buffer	Invitrogen Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Random Hexamer primer	Invitrogen Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
dNTP-Mix	Invitrogen Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	Invitrogen Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Brilliant II SybrGreen with LowRoy Master Mix	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Zentrifuge Eppendorf 5430	Eppendorf Deutschland	Wesseling-Berzdorf, Deutschland

3.3. Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen erfolgten mithilfe der Statistiksoftware SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Die Daten wurden zuerst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Lag eine Normalverteilung vor, dann erfolgte die statistische Auswertung mit der einfaktoriellen Varianzanalyse. Bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit (p -Wert) von $p \leq 0,05$ wurde eine Signifikanz angenommen. In einem solchen Fall wurde zur Überprüfung der Gruppenunterschiede als Post-Hoc-Signifikanztest der LSD-Test angewendet.

4. Ergebnisse

4.1. *In vitro*-Untersuchungen

In den *in vitro*-Untersuchungen waren die Bakterien mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, sodass die Fluoreszenz als Maß für eine Adhäsion zu den IPEC-Zellen betrachtet wurde. Damit die Eigenfluoreszenz der Epithelzellen sowie der verschiedenen Testsubstanzen die Ergebnisse nicht beeinflussen konnten, wurde der Wert der jeweiligen Negativkontrolle vom eigentlichen Messwert abgezogen. Die *in vitro*-Versuche fanden an jeweils fünf verschiedenen Tagen statt. Daher wurden die absoluten Ergebnisse in ein relatives Verhältnis zur Positivkontrolle gesetzt, damit die Ergebnisse der fünf Versuchstage besser miteinander verglichen werden konnten. An jedem Versuchstag wurde eine Färbekontrolle durchgeführt, um Fehlmessungen ausschließen zu können.

In den *in vitro*-Untersuchungen zeigten sich signifikante Effekte auf die Adhäsion zwischen dem enteropathogenen *E. coli*-Stamm (O149:K91:K88ac) und der IPEC-J2-Zelllinie (Tabelle 4.1). Die vorliegenden Messwerte zeigten in den höchsten Konzentrationen der beiden Apfelextrakte (5,5 mg/l), des Pektins (1 g/l) und des Bockshornkleesamens (10 g/l) signifikante Reduktionen der mit dem *E. coli*-Stamm markierten Zellen ($p < 0,05$). Doch auch in den niedrigsten Konzentrationen des Bockshornkleesamens (0,01 g/l und 0,001 g/l; $p = 0,008$; $p = 0,001$) sowie des Pektins (0,0001 g/l; $p = 0,001$) konnte eine im Vergleich zur Kontrolle niedrigere Adhäsion festgestellt werden, sodass der Effekt nicht konzentrationsabhängig war.

In der niedrigsten und mittleren Konzentration von Glucoraphanin, in der 0,1 g/l-Konzentration von Pektin sowie in den drei niedrigsten Konzentrationen von Fresta F[®] (0,1 g/l; 0,01 g/l und 0,001 g/l) war der relative Anteil der fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle sogar erhöht.

Ergebnisse

Tabelle 4.1: Einfluss der phyto-genen Substanzen auf die Adhäsion zwischen einem enteropathogenen *Escherichia coli* - Stamm und IPEC-J2-Zellen ausgedrückt als relativer Anteil der fluoreszierenden Zellen (Mittelwerte und Standardabweichung, n = 5)

Substanz	Konzentration / Verdünnung	Relativer Anteil der fluoreszierenden Zellen in %	p-Wert verglichen mit der Positivkontrolle
Apfelextrakt 1	0	100	
	0,14 mg/l ¹	105 ± 7,73	0,657
	0,27 mg/l ¹	100 ± 3,41	0,973
	5,5 mg/l ¹	65,2 ± 31,5	0,004
Apfelextrakt 2	0	100	
	0,14 mg/l ¹	100 ± 15,4	0,990
	0,27 mg/l ¹	95,6 ± 13,9	0,716
	5,5 mg/l ¹	42,2 ± 31,7	<0,001
Fresta F [®]	0	100	
	10 g/l	104 ± 6,70	0,750
	1 g/l	119 ± 14,9	0,184
	0,1 g/l	112 ± 31,6	0,395
	0,01 g/l	97,9 ± 11,5	0,885
	0,001 g/l	58,2 ± 39,6	0,007
Bockshornkleesamen	0	100	
	10 g/l	49,7 ± 28,3	0,008
	1 g/l	33,5 ± 27,8	0,001
	0,1 g/l	69,7 ± 27,5	0,096
	0,01 g/l	78,5 ± 25,9	0,231
	0,001 g/l	33,7 ± 39,6	0,001
Pektin	0	100	
	1 g/l	48,1 ± 31,7	0,001
	0,1 g/l	112 ± 20,2	0,417
	0,01 g/l	76,5 ± 27,7	0,107
	0,001 g/l	118 ± 23,5	0,223
	0,0001 g/l	33,3 ± 15,1	<0,001
Sulforaphan	0	100	
	0,33 mg/l ¹	101 ± 1,05	0,924
	0,66 mg/l ¹	96,6 ± 6,05	0,695
	1,32 mg/l ¹	79,4 ± 26,0	0,027
Glucoraphanin	0	100	
	0,082 mg/l ¹	104 ± 13,8	0,857
	0,16 mg/l ¹	125 ± 59,0	0,224
	0,33 mg/l ¹	86,7 ± 17,9	0,515

p = Überschreitungswahrscheinlichkeit

4.2. In vivo-Versuche

4.2.1. Versuchsdiäten

In dem durchgeführten Fütterungsversuch wurden vier verschiedene Versuchsdiäten eingesetzt, die aus der gleichen Basismischung bestanden und sich lediglich in den Futterzusatzstoffen unterschieden. Diese wurden für jeden Versuchsdurchlauf separat analysiert und als Mittelwert in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 4.2: Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Spurenelementgehalt der vier Versuchsdiäten (Mittelwerte)

	Gruppe			
	A	B	C	D
Trockensubstanz (g/kg US)	898	898	894	893
Rohasche (g/kg TS)	76,8	77,1	85,6	77,2
Rohprotein (g/kg TS)	232	233	226	243
Rohfett (g/kg TS)	34,5	34,3	33,8	33,8
Rohfaser (g/kg TS)	49,6	48,5	49,8	44,5
Stärke (g/kg TS)	375	384	416	394
Kalzium (g/kg TS)	12,9	15,5	13,8	13,0
Phosphor (g/kg TS)	8,59	8,22	9,02	8,54
Magnesium (g/kg TS)	2,65	2,66	2,88	2,53
Natrium (g/kg TS)	1,90	1,78	2,62	1,31
Kalium (g/kg TS)	6,61	7,09	7,53	7,49
Eisen (mg/kg TS)	271	367	327	283
Kupfer (mg/kg TS)	15,6	19,4	22,7	12,2
α -Tocopherol (mg/kg US)	10,4	9,89	10,4	10,5

TS = Trockensubstanz; US = ursprüngliche Substanz

4.2.2. Zootechnische Leistungen

4.2.2.1. Gesundheitszustand

Im ersten Versuchsdurchgang mussten drei Tiere (eins aus Gruppe Bockshornkleesamen, zwei aus Gruppe Fresta) über drei Tage aufgrund von Fieber und Nasenausfluss antibiotisch behandelt werden. Im zweiten Versuchsdurchgang musste ein Tier (Gruppe Fresta) wegen eines Klauenabszesses antibiotisch versorgt werden. Die übrigen Tiere zeigten keine gesundheitlichen Auffälligkeiten.

4.2.2.2. Lebendmasse und Lebendmassezunahme

Die Versuchstiere wurden zu Beginn der Versuche entsprechend ihres Einstallgewichtes gleichmäßig auf die vier Versuchsgruppen verteilt. Die Futteraufnahme war in den ersten beiden Versuchstagen sehr gering, was sich zum Teil in einer Reduktion der Lebendmasse oder einer geringen Lebendmassezunahme zeigte. Zwischen den Versuchsgruppen konnten in den vier Versuchswochen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Lebendmasse sowie der Lebendmassezunahmen festgestellt werden. Die Lebendmassen der Versuchstiere der vier Versuchsgruppen wurden in Tabelle 4.3 und die Lebendmassezunahmen in Tabelle 4 dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Tötungstage der Ferkel wurde die Lebendmasse und -zunahme sowie die Futteraufnahme bei einigen Ferkeln bis zum letzten Tötungstag rechnerisch interpoliert, um die Daten vergleichen zu können.

Tabelle 4.3: Mittlere Lebendmasse der Versuchsferkel der vier Versuchsgruppen bei Einstallung und in den einzelnen Versuchswochen in kg (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	A (n = 6)	B (n = 6)	C (n = 6)	D (n = 6)	p
Einstellung	7,25 ± 1,21	7,14 ± 1,24	7,18 ± 1,52	7,28 ± 0,90	0,991
Woche 1	7,74 ± 0,98	7,01 ± 1,40	7,74 ± 1,67	7,45 ± 0,90	0,489
Woche 2	9,58 ± 1,27	9,01 ± 1,99	9,78 ± 2,21	9,31 ± 1,20	0,737
Woche 3	12,1 ± 1,72	11,7 ± 2,31	12,6 ± 2,94	11,6 ± 1,64	0,735
Woche 4	15,7 ± 2,08	15,8 ± 2,90	16,1 ± 2,91	14,6 ± 1,96	0,481

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C= Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt, p = Überschreitungswahrscheinlichkeit

Tabelle 4.4: Mittlere Lebendmassezunahme der Versuchsferkel der vier Versuchsgruppen in den einzelnen Versuchswochen sowie während des gesamten Versuchszeitraums in kg (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	A (n = 6)	B (n = 6)	C (n = 6)	D (n = 6)	p
Woche 1	0,48 ± 0,75	-0,12 ± 0,82	0,57 ± 0,82	0,17 ± 0,48	0,101
Woche 2	1,84 ± 0,84	2,00 ± 1,11	2,04 ± 0,81	1,87 ± 0,79	0,942
Woche 3	2,51 ± 0,99	2,69 ± 0,59	2,78 ± 0,96	2,31 ± 0,74	0,559
Woche 4	3,64 ± 1,05	4,07 ± 1,39	3,52 ± 0,89	2,94 ± 0,91	0,106
Gesamt	8,47 ± 2,26	8,64 ± 2,82	8,91 ± 1,90	7,30 ± 2,00	0,330

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C= Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt, p = Überschreitungswahrscheinlichkeit

Ergebnisse

4.2.2.3. Futteraufnahme und Futteraufwand

Die mittlere tägliche Futteraufnahme wurde pro Flatdeck als experimentelle Einheit ermittelt. Die Futtermittelverluste konnten mithilfe von Auffangblechen unter den Futterautomaten ermittelt werden und wurden bei der Berechnung der Futteraufnahme berücksichtigt. Der Futteraufwand wurde aus der wöchentlichen Futteraufnahme sowie der wöchentlichen Lebendmassezunahme errechnet. Bei der mittleren täglichen Futteraufnahme sowie beim Futteraufwand der vier Versuchsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In den ersten beiden Tagen der ersten Versuchswoche mussten die Ferkel durch Einweichen des Futters mit Wasser zum Fressen animiert werden, da sie eine geringe Futteraufnahme zeigten. Die mittlere tägliche Futteraufnahme aller Versuchsgruppen ist in Tabelle 4.5 und der Futteraufwand in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.5: Mittlere tägliche Futteraufnahme pro Ferkel in kg errechnet für jedes Ferkel pro Flatdeck (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	A (n = 6)	B (n = 6)	C (n = 6)	D (n = 6)	<i>p</i>
Woche 1	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,04	0,11 ± 0,06	0,07 ± 0,05	0,466
Woche 2	0,31 ± 0,10	0,25 ± 0,14	0,26 ± 0,14	0,23 ± 0,14	0,768
Woche 3	0,49 ± 0,06	0,50 ± 0,14	0,48 ± 0,14	0,42 ± 0,15	0,705
Woche 4	0,80 ± 0,14	0,81 ± 0,21	0,72 ± 0,11	0,67 ± 0,20	0,483
Gesamt	0,42 ± 0,08	0,41 ± 0,11	0,39 ± 0,08	0,35 ± 0,12	0,609

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C = Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt, *p* = Überschreitungswahrscheinlichkeit

Tabelle 4.6: Futteraufwand der vier Versuchsgruppen während der vier Versuchswochen (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	A (n = 6)	B (n = 6)	C (n = 6)	D (n = 6)	<i>p</i>
Woche 1	-0,19 ± 5,07	1,55 ± 3,66	0,18 ± 3,05	-2,88 ± 5,23	0,104
Woche 2	1,54 ± 1,06	0,93 ± 0,47	0,78 ± 1,12	0,85 ± 0,46	0,112
Woche 3	1,60 ± 0,83	1,48 ± 0,80	1,27 ± 0,28	1,40 ± 0,61	0,698
Woche 4	1,61 ± 0,40	1,53 ± 0,32	1,49 ± 0,24	1,77 ± 0,98	0,668
W2 - W4	1,58 ± 0,40	1,31 ± 0,34	1,19 ± 0,45	1,34 ± 0,46	0,152

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C = Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt, *p* = Überschreitungswahrscheinlichkeit

4.2.3 Verdauungsphysiologische Parameter

4.2.3.1 Scheinbare Gesamtverdaulichkeit

Die Ergebnisse der Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins sowie der Aminosäuren sind in Tabelle 4.7 zu sehen. Bei der Auswertung der Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen feststellbar. Bei der Gesamtverdaulichkeit der Aminosäuren ergaben sich bei Threonin, Valin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin und Lysin signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Die Gesamtverdaulichkeit von Threonin, Valin, Isoleucin und Lysin war in der Apfelextraktgruppe signifikant höher verglichen mit den anderen drei Fütterungsgruppen. Die Gesamtverdaulichkeit der Aminosäuren Leucin und Tyrosin war in der Apfelextraktgruppe signifikant höher als in den Fütterungsgruppen B (Bockshornkleesamen) und C (Fresta F[®]).

Ergebnisse

Tabelle 4.7: Scheinbare Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins und der Aminosäuren in % (Mittelwert und Standardabweichung)

	A	B	C	D	<i>p</i>
	(n = 12)	(n = 12)	(n = 12)	(n = 12)	
Rohprotein	75,2 ± 3,45	69,4 ± 15,7	72,6 ± 7,75	74,8 ± 9,77	0,495
Asparaginsäure	80,3 ± 3,12	77,6 ± 12,9	79,3 ± 10,2	84,8 ± 7,72	0,276
Threonin	67,8 ^a ± 9,73	67,0 ^a ± 11,4	62,7 ^a ± 19,5	81,9 ^b ± 8,00	0,005
		(n = 11)			
Serin	80,4 ± 3,62	76,0 ± 14,3	77,9 ± 11,5	84,1 ± 8,54	0,257
Glutaminsäure	84,7 ± 2,47	80,0 ± 13,7	83,3 ± 7,63	85,1 ± 7,30	0,470
Glycin	74,9 ± 2,30	72,1 ± 6,20	71,1 ± 11,1	74,3 ± 11,5	0,675
		(n = 11)			
Alanin	64,8 ± 5,53	64,0 ± 7,66	59,4 ± 16,5	71,7 ± 12,6	0,086
Valin	65,0 ^a ± 9,93	60,2 ^a ± 12,0	59,8 ^a ± 16,8	80,6 ^a ± 7,04	<0,001
Isoleucin	62,4 ^a ± 15,5	56,1 ^a ± 17,7	62,3 ^a ± 15,8	83,7 ^b ± 6,20	<0,001
		(n = 11)	(n = 11)		
Leucin	73,9 ^{ab} ± 6,63	67,5 ^a ± 14,9	70,4 ^a ± 11,3	81,8 ^b ± 6,49	0,011
Tyrosin	72,3 ^{ab} ± 7,66	64,4 ^a ± 16,6	68,5 ^a ± 12,9	80,9 ^b ± 9,11	0,012
Phenylalanin	68,4 ± 4,41	67,5 ± 8,90	68,7 ± 13,1	77,3 ± 11,0	0,070
Histidin	87,3 ± 6,05	86,8 ± 7,68	88,0 ± 8,09	85,0 ± 10,3	0,824
Lysin	74,3 ^a ± 5,76	70,9 ^a ± 12,4	74,8 ^a ± 8,83	82,7 ^b ± 7,23	0,017
Arginin	85,3 ± 3,73	81,0 ± 11,5	83,5 ± 8,29	88,8 ± 5,35	0,110
Prolin	83,2 ± 4,36	76,7 ± 12,1	81,7 ± 7,23	85,3 ± 5,30	0,061
Cystein	81,7 ± 2,15	76,1 ± 12,6	77,8 ± 7,03	81,2 ± 10,1	0,517
Methionin	78,5 ± 4,16	74,3 ± 14,3	75,1 ± 6,87	80,3 ± 8,97	0,499

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C = Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt, *p* = Überschreitungswahrscheinlichkeit

4.2.3.2. Praecaecale Verdaulichkeit

Die Werte der ermittelten praecaecalen Verdaulichkeit des Rohproteins sowie der Aminosäuren sind in Tabelle 4.8 zu sehen. Bei der praecaecalen Verdaulichkeit der Aminosäuren Valin und Isoleucin ergaben sich Unterschiede (*p* < 0,05) innerhalb der vier Fütterungsgruppen. Die praecaecale Verdaulichkeit von Valin war in der Fütterungsgruppe B (Bockshornkleesamen) signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Fütterungsgruppe D (Ap-

Ergebnisse

felextrakt). Die praecaecale Verdaulichkeit von Isoleucin war in der Fütterungsgruppe D (Apfelextrakt) signifikant höher als in den Fütterungsgruppen B (Bockshornkleesamen) und C (Fresta F[®]). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Fütterungsgruppen in Bezug auf die praecaecale Verdaulichkeit des Rohproteins.

Tabelle 4.8: Praecaecale Verdaulichkeit des Rohproteins und der Aminosäuren (Mittelwert und Standardabweichung)

	A (n = 8)	B (n = 8)	C (n = 10)	D (n = 10)	p
Rohprotein	58,0 ± 21,2	63,2 ± 6,23	67,4 ± 11,5 (n = 12)	66,2 ± 7,06 (n = 11)	0,374
Asparaginsäure	70,4 ± 14,4	76,5 ± 6,36	76,5 ± 10,1	79,3 ± 8,19	0,329
Threonin	52,8 ± 23,8 (n = 7)	50,2 ± 10,4	52,1 ± 19,4	69,0 ± 11,2	0,073
Serin	68,3 ± 16,5	72,5 ± 8,75	75,4 ± 10,3	77,4 ± 9,63	0,393
Glutaminsäure	73,6 ± 12,8	72,1 ± 8,01	74,4 ± 11,4	74,3 ± 10,0	0,968
Glycin	48,3 ± 26,0 (n = 7)	47,8 ± 14,6	53,1 ± 19,4	49,6 ± 19,7	0,940
Alanin	52,2 ± 24,4	54,6 ± 9,92	57,6 ± 18,8	64,7 ± 12,7	0,446
Valin	60,9 ^c ± 13,1 (n = 6)	41,7 ^a ± 14,6 (n = 7)	54,2 ^{ac} ± 11,6 (n = 8)	67,3 ^{bc} ± 15,1	0,007
Isoleucin	63,5 ^{ab} ± 13,7 (n = 6)	48,4 ^a ± 17,1	60,7 ^a ± 15,2	77,0 ^b ± 11,9	0,003
Leucin	61,2 ± 19,8	58,8 ± 11,0	62,3 ± 14,6	72,4 ± 11,9	0,210
Tyrosin	61,4 ± 23,6	63,3 ± 11,0	66,0 ± 12,8	76,2 ± 10,1	0,165
Phenylalanin	51,4 ± 24,0	56,1 ± 14,4	58,7 ± 20,7	64,1 ± 17,2	0,577
Histidin	79,4 ± 16,6	83,5 ± 7,30	84,5 ± 12,1	74,4 ± 13,9	0,321
Lysin	79,0 ± 12,1	78,2 ± 7,4	78,3 ± 9,97	85,4 ± 6,50	0,261
Arginin	75,3 ± 11,4	72,8 ± 11,8	78,2 ± 8,41	82,0 ± 5,96	0,211
Prolin	66,0 ± 15,1 (n = 7)	58,1 ± 11,7 (n = 6)	62,6 ± 14,2	68,3 ± 12,6 (n = 9)	0,519
Cystein	61,92 ± 15,1 (n = 6)	60,2 ± 5,39 (n = 6)	67,5 ± 12,6	65,5 ± 8,80 (n = 8)	0,543
Methionin	82,3 ± 4,97 (n = 6)	81,6 ± 4,18 (n = 6)	84,8 ± 5,78	84,5 ± 5,51 (n = 8)	0,577

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C= Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt, p = Überschreitungswahrscheinlichkeit

4.2.3.3. pH - Werte in Urin, Digesta und Kot

Die mittleren pH-Werte aus Urin, Kot und der Ileumdigesta sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst. Die Probenanzahl variiert, da nicht von jedem Versuchstier die entsprechende Menge Urin oder Digesta gewonnen werden konnte. Es wurden weder bei den pH – Werten im Urin

Ergebnisse

und Kot noch bei denen in der Digesta signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt.

Tabelle 4.9: Mittlere pH-Werte von Digesta, Urin und Kot der Absetzferkel der 4 Fütterungsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	A	B	C	D	<i>p</i>
pH Urin	6,28 ± 0,66 (n = 11)	6,16 ± 0,78 (n = 12)	6,31 ± 0,38 (n = 9)	6,78 ± 0,64 (n = 12)	0,174
pH Ileum	6,56 ± 0,71 (n = 11)	6,67 ± 0,78 (n = 11)	6,67 ± 0,60 (n = 12)	6,86 ± 0,55 (n = 11)	0,764
pH Kot	6,91 ± 0,32 (n = 12)	6,51 ± 0,64 (n = 12)	6,80 ± 0,39 (n = 12)	6,97 ± 0,44 (n = 12)	0,085

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C= Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt, *p* = Überschreitungswahrscheinlichkeit

4.2.4. Biochemische Parameter

4.2.4.1. Aktivitäten verschiedener intestinaler Enzyme

Die ermittelten Aktivitäten der Enzyme Aminopeptidase N sowie der Disaccharasen Laktase, Maltase und Saccharase aus der Bürstensaummembran des Jejunums sind in Tabelle 4.10 dargestellt. Bezüglich der alkalischen Phosphatase gab es tendenzielle Unterschiede (*p* = 0,057) zwischen den vier Fütterungsgruppen. Zwischen den vier Versuchsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der anderen ausgewählten intestinalen Enzyme.

Ergebnisse

Tabelle 4.10: Aktivität (in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Protein) der alkalischen Phosphatase, L-Amino-peptidase N, Laktase, Maltase und Saccharase aus der Bürstensaummembran des Jejunums der Versuchsferkel der 4 Fütterungsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung, $n = 12$)

Gruppe	A ($n = 12$)	B ($n = 12$)	C ($n = 12$)	D ($n = 12$)	p
Alkalische Phosphatase	2066 ± 656 ($n = 11$)	2696 ± 798 ($n = 11$)	1833 ± 799 ($n = 10$)	$1836 \pm 966,2$	0,057
L-Amino-peptidase N	$89,5 \pm 28,0$ ($n = 11$)	$105 \pm 30,1$	$89,2 \pm 25,4$ ($n = 11$)	$84,1 \pm 33,0$	0,369
Laktase	$150 \pm 84,9$	131 ± 103	$108 \pm 58,2$ ($n = 11$)	$137 \pm 50,1$	0,619
Maltase	1493 ± 525	1285 ± 386 ($n = 11$)	1114 ± 347 ($n = 11$)	1526 ± 546	0,134
Saccharase	358 ± 132	405 ± 174	348 ± 159	341 ± 126	0,711

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C= Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt, p = Überschreitungswahrscheinlichkeit

Ergebnisse

4.2.4.2. Antioxidative Aktivität im Plasma

Die Ergebnisse der Messung der antioxidativen Aktivität im Plasma mittels des FRAP- und des TEAC-Tests sind in der Tabelle 4.11 dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen festgestellt werden.

Tabelle 4.11: Antioxidative Kapazität im Blutplasma bestimmt durch das FRAP-Tests in $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{l}$ und das TEAC-Tests in $\mu\text{mol Trolox}/\text{l}$ (Mittelwert und Standardabweichung, $n = 12$)

Gruppe	A	B	C	D	<i>p</i>
FRAP	97,4 ± 39,0	108 ± 32,2	112 ± 44,3	123 ± 70,1	0,624
TEAC	162 ± 47,1	160 ± 21,2 ($n = 11$)	153 ± 22,9	165 ± 30,1	0,713

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C = Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt, *p* = Überschreitungswahrscheinlichkeit,

TEAC = Trolox equivalent antioxidative capacity; FRAP = Ferric reducing ability of plasma

4.2.5. In vitro-Untersuchungen von Darmgewebe der unterschiedlich gefütterten Ferkel mittels der Ussingkammer

In der Ussingkammer wurde der Kurzschlussstrom I_{sc} durch das Epithel nach Zugabe von Glukose, Phlorizin und Carbachol gemessen. Bei den Ergebnissen dieser elektrophysiologischen Messungen am isolierten Jejunumgewebe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Fütterungsgruppen festgestellt werden, jedoch war der Kurzschlussstrom nach der Zugabe von Glukose in der Fütterungsgruppe D numerisch erhöht. In den Fütterungsgruppen A, C und D wurden jeweils acht Ferkel beprobt, in der Fütterungsgruppe B konnten nur sieben Jejunumproben für die Ussingkammer verwendet werden.

In Tabelle 4.12 sind die Basalwerte des Kurzschlussstroms der vier Versuchsgruppen aufgeführt.

Tabelle 4.12: Basalwerte des Kurzschlussstroms I_{sc} in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ der vier Versuchsgruppen (Mittelwert ± Standardabweichung)

Gruppe	A	B	C	D
	1,28 ± 11,8	-0,35 ± 14,6	-0,52 ± 13,7	19,9 ± 13,3

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C = Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt

Ergebnisse

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen am isolierten Jejunumgewebe sind in Abbildung 4.1 bis Abbildung 4.3 dargestellt.

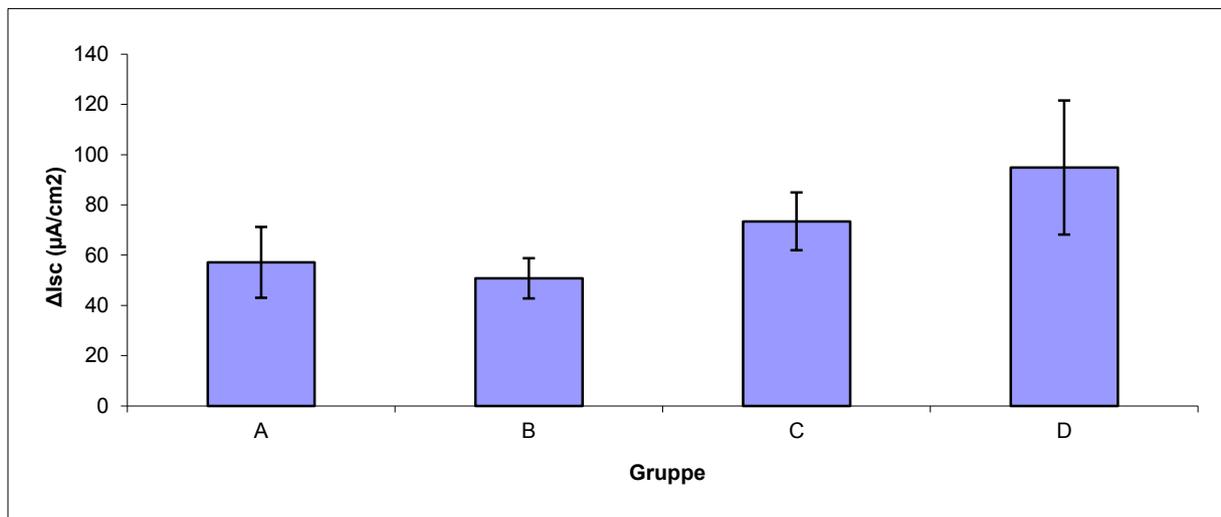


Abbildung 4.1: Kurzschlussstrom ΔI_{sc} in $\mu A/cm^2$ der vier Fütterungsgruppen 3 min nach Zugabe von Glukose (10 mmol/l)

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C= Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt

Die Überschreitungswahrscheinlichkeit p ist größer 0,05.

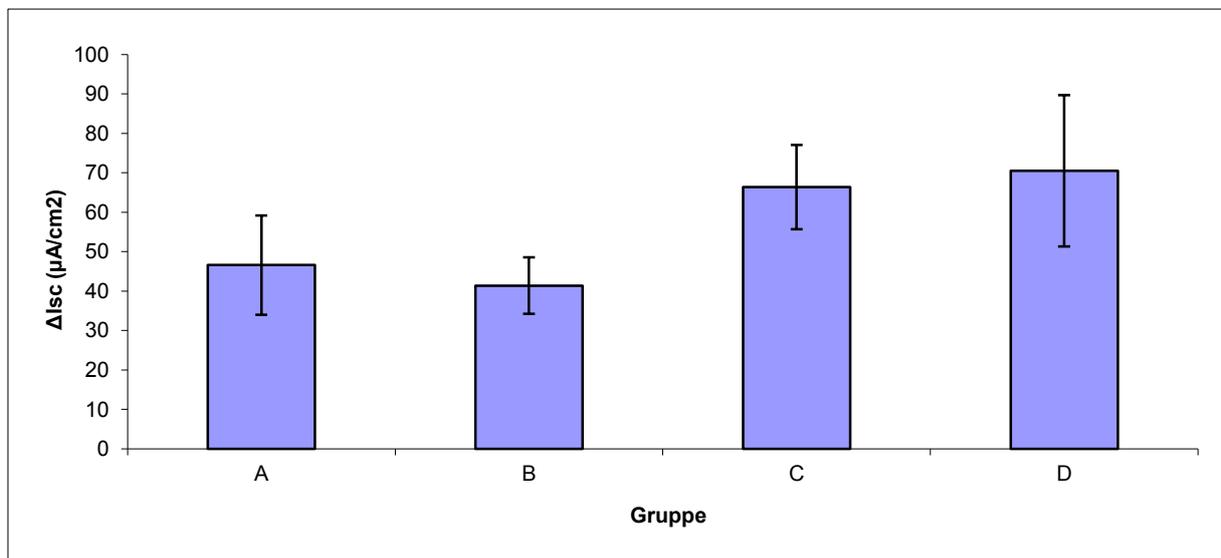


Abbildung 4.2: Kurzschlussstrom ΔI_{sc} in $\mu A/cm^2$ der vier Fütterungsgruppen nach Zugabe von Phlorizin (100 $\mu mol/l$)

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C= Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt

Die Überschreitungswahrscheinlichkeit p ist größer 0,05.

Ergebnisse

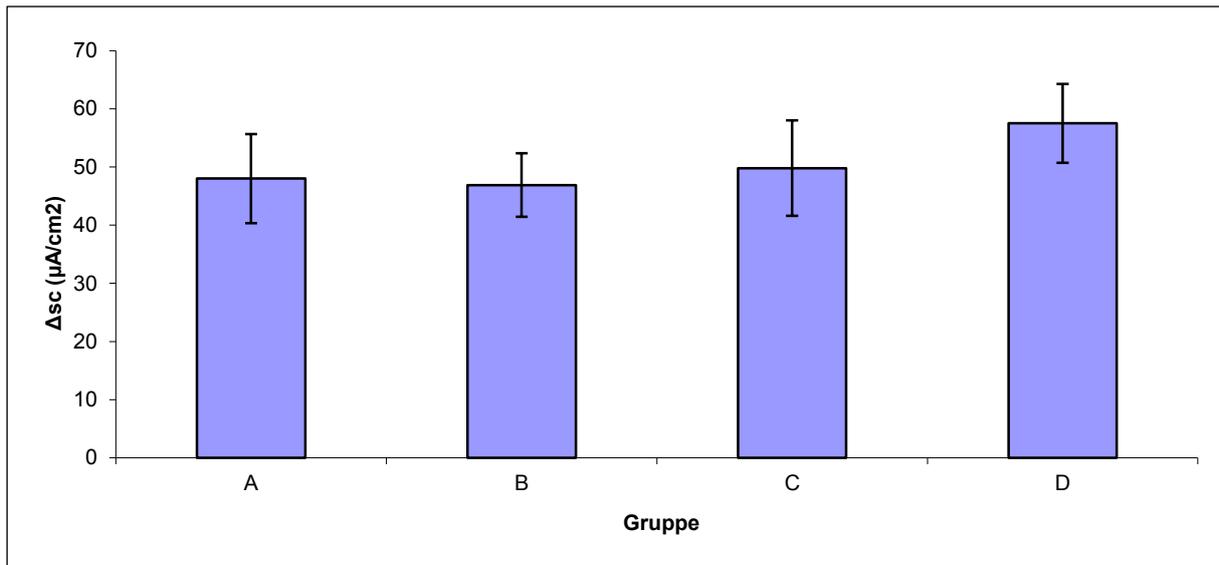


Abbildung 4.3: Kurzschlussstrom ΔI_{sc} in $\mu A/cm^2$ der vier Fütterungsgruppen nach Zugabe von Carbachol (100 $\mu mol/l$)

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C = Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt

Die Überschreitungswahrscheinlichkeit p ist größer 0,05.

4.2.6 Bestimmung der Genexpression ausgewählter intestinaler Enzyme

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genexpression aus jejunaler RNA auf die Zielgene Laktase-Phlorizin-Hydrolase, natriumabhängiger Glukose-Transporter-1 (SGLT-1) und Aminopeptidase N sowie die Haushaltsgene sind in Tabelle 4.13 als relative Expression gegenüber der Kontrollgruppe (n = 12) aufgeführt.

Die Analyse der Genexpression ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Fütterungsgruppen bezüglich der Zielgene.

Die Saccharaseexpression war sowohl in der Fütterungsgruppe B (Bockshornkleesamen) als auch in der Fütterungsgruppe C (Fresta F[®]) weniger stark als in der Kontrollgruppe, sodass sich signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe ergaben ($p = 0,045$; $p = 0,047$).

Ergebnisse

Tabelle 4.13: Relative Expression der Zielgene der drei Fütterungsgruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe

Gene	B (n = 11)			C (n = 11)			D (n = 12)		
	Relative Expression	Min - Max	p	Relative Expression	Min - Max	p	Relative Expression	Min - Max	p
SDHA	1,09			1,09			1,20		
Bet2Glob	0,92			0,92			0,91		
Laktase-Phlorizin-Hydrolase	1,92	0,05 - 34,2	0,48	1,50	0,11 - 21,7	0,67	0,94	0,07 - 11,8	0,930
SGLT1	0,77	0,46 - 1,44	0,29	0,83	0,42 - 1,59	0,50	0,95	0,53 - 1,78	0,839
Saccharase	0,59	0,27 - 1,4	0,05	0,61	0,27 - 1,30	0,05	0,86	0,36 - 2,19	0,528
Aminopeptidase N	0,67	0,28 - 1,69	0,12	0,79	0,40 - 1,74	0,29	0,86	0,40 - 1,94	0,481

Gruppe A = Kontrollgruppe; Gruppe B = Bockshornkleesamen; Gruppe C= Fresta F[®]; Gruppe D = polyphenolreicher Apfelextrakt; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit

SGLT-1 = natriumabhängiger Glukose-Transporter 1; SDHA = succinate dehydrogenase complex, subunit A; Bet2Glob = Beta 2 microglobulin

Min – Max = Minimum - Maximum

5. Diskussion

5.1. Hintergrund und Ziel der Arbeit

Die kritischste Phase in Bezug auf die Gesundheit bei Ferkeln stellt die Zeit des Absetzens dar. Aufgrund der verschiedenen Stressfaktoren wie Futterumstellung, Trennung von der Mutter sowie Umgebungsänderungen sind Absetzferkel sehr anfällig für Krankheiten des Verdauungstrakts. Um die Absetzferkelverluste so gering wie möglich zu halten, ist es von großem Interesse Futterzusätze einzusetzen, die sowohl eine Krankheitsprävention bewirken als auch die Verdaulichkeit des Futters verbessern, um den Futteraufwand gering zu halten.

In verschiedenen wissenschaftlichen Versuchen wurde gezeigt, dass phyto gene Additive wie ätherische Öle und Kräuter die Leistungsparameter bei Ferkeln erhöhen und zugleich einen gesundheitsfördernden Effekt erzielen können. Diese Effekte beruhen möglicherweise auf der Stimulation intestinaler Sekretionsprozesse, woraus eine erhöhte enzymatische Verdauungskapazität resultieren könnte (Franz et al. 2010). Holundertrester, welcher einen hohen Anteil an Polyphenolen aufweist, führte bei einer Fütterungsstudie mit Absetzferkeln zu einer erhöhten Futteraufnahme sowie Erhöhung der Lebendmassezunahmen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Blank und Wolfram 2010). In einer Studienreihe mit Ratten, die verschiedene Substanzen, unter anderem Bockshornklee erhielten, wurden die Aktivitäten der intestinalen Disaccharidasen sowie die der intestinalen Lipase untersucht. Diese erhöhten sich schon durch eine einmalige Gabe Bockshornklee signifikant (Platel und Srinivasan 1996).

Ziel dieser Arbeit war es, *in vitro* mögliche antiadhäsive Effekte von phyto genen Futterzusatzstoffen zwischen einer porcinen intestinalen epithelialen Zelllinie und einem enteropathogenen *Escherichia coli*-Stamm nachzuweisen sowie ausgewählte phyto gene Futterzusatzstoffe im Hinblick auf verdauungsphysiologische Aspekte in Absetzferkeln zu untersuchen. Im Rahmen von *in vivo*-Versuchen wurden die phyto genen Futterzusatzstoffe auf eine Erhöhung der Verdaulichkeit, der Aktivität spezifischer intestinaler Enzyme und auf eine Verbesserung der Leistung überprüft.

5.2. *In vitro*-Untersuchungen

Die im Rahmen der *in vitro*-Untersuchungen getesteten phyto genen Substanzen, Fresta F[®], Pektin, Bockshornkleesamen, zwei polyphenolreiche Apfelextrakte, Glucoraphanin und Sulforaphan zeigten zum Teil signifikante Effekte auf die Adhäsion zwischen dem, fluoreszenzmarkierte *Escherichia coli*-Stamm und der Zelllinie IPEC-J2. Die Menge der fluoreszierenden Zellen wurde als Maßzahl der „infizierten“ IPEC-J2-Zellen definiert. Die Verdünnungen des Sulforaphans und Glucoraphanins sowie der Apfelextrakte wurden aufgrund zuvor berechneter Molmassen bestimmt. Da in vorangegangenen Studien bereits eine antiadhäsive Wirkung

von einigen der getesteten Substanzen festgestellt wurde, wurden in dieser Untersuchung gleiche Substanzen in anderen Konzentrationen eingesetzt. So zeigte sich die antiadhäsive

Wirkung von Bockshornkleesamen und Fresta F[®] bereits bei Untersuchungen mit vergleichbarem Versuchsdesign (Gärtner 2011). Auch antiadhäsive Wirkungen von Polyphenolen konnten bereits nachgewiesen werden. In einer Untersuchung wurde der Einfluss von Polyphenolextrakten auf die Adhäsion zwischen einem enterotoxischen *E. coli*-Stamm und aus Schweinen isolierten Bürstensaummembranen getestet (Verhelst et al. 2010).

5.2.1. Kritik der Methode

Die *in vitro*-Versuche wurden an fünf verschiedenen Tagen durchgeführt, sodass es zu tagessabhängigen Schwankungen bei den Infektionsraten der Bakterien bzw. bei den Fluoreszenzwerten der Positivkontrollen kam. Auch in anderen Studien mit IPEC-J2-Zelllinien und *E. coli*-Stämmen kam es zu solchen Tagesschwankungen (Mader 2011). Für eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchstage wurden die Werte der Fluoreszenz der Positivkontrolle und der getesteten Substanzen in ein relatives Verhältnis gesetzt.

5.2.2. Einfluss der Testsubstanzen

Durch den Einfluss der beiden polyphenolhaltigen Apfelextrakte in einer Verdünnung von 5,5 mg/l konnte die Menge der fluoreszierenden IPEC-J2-Zellen signifikant um 34,8 % (Apfelextrakt 1) bzw. 57,8 % (Apfelextrakt 2) im Vergleich zur Positivkontrolle reduziert werden. Polyphenole wurden in anderen Studien hinsichtlich ihrer antimikrobiellen und auch ihrer antiadhäsiven Fähigkeiten untersucht, die die genannten Effekte bestätigen. Allerdings unterscheidet sich die Polyphenolzusammensetzung, sodass keine eindeutigen Aussagen getroffen werden können. In einer Studie wurden drei verschiedene Polyphenolextrakte in einem Adhäsionstest mit porcinen Bürstensaummembranen getestet. Alle drei Extrakte reduzierten die Adhäsion zwischen einem F4ac-positiven *E. coli*-Stamm und der Bürstensaummembran (Verhelst et al. 2010). Extrakte aus *Pelargonium sidoides*, einem Storchschnabelgewächs, führten zu einer signifikanten Hemmung der Adhäsion zwischen humanen Epitheliumzellen (Hep2) und einem *Streptococcus A*-Stamm, sofern die Bakterien mit den Extrakten vorbehandelt wurden. Eine Inkubation der Hep2-Zellen mit den Extrakten führte zu keiner Reduktion. Die Autoren vermuten, dass die Proanthocyanidine eine maßgebliche Rolle bei den antiadhäsiven Prozessen spielen könnten (Janecki et al. 2011). Einfluss auf die Adhäsion zwischen humanen Kolonkarzinomzellen (CaCo-2) und einem *Escherichia coli*-Stamm konnte auch bei Polyphenolen wie Resveratrol nachgewiesen werden. Resveratrol hemmte die Adhäsion signifikant um bis zu 80 % (Selma et al. 2012). Zahlreiche Studien wurden mit Cranberrysäften und -extrakten durchgeführt. Diese zeichnen sich durch hohe Polyphenolgehalte aus und zeigten signifikante antiadhäsive Aktivitäten gegenüber *E. coli* (Turner et al. 2005; Ermel et al. 2012).

Signifikante Reduktionen der infizierten Zellen erfolgten auch durch Bockshornkleesamen. In einer vorangegangenen Studie wurde bereits der Einfluss von Bockshornkleesamen auf die Adhäsion zwischen der IPEC-J2-Zelllinie und dem *E. coli*-Stamm getestet. Auch bei dieser Studie wurde ein Effekt festgestellt (Gärtner 2011). Bockshornkleesamen beinhalten als eine

der aktiven Hauptkomponenten Galaktomannane. Bereits vor einigen Jahrzehnten wurde festgestellt, dass Enterobakteriaceen wie *E. coli* mit lektinartigen-Adhäsinen an den Fimbrien an die Wirtszelle binden. Viele Enterobakterien bilden Typ1-Fimbrien mit spezifischen Adhäsinen aus, welche Mannose und Galaktose, die Bestandteile der Oberflächenrezeptoren sind, erkennen (Ofek et al. 1977; Kastner et al. 2002). Liegen Substanzen mit ähnlichen Strukturen wie die der Oberflächenrezeptoren vor, wie Galaktomannane, könnte *E. coli* aufgrund der kompetitiven Hemmung an diesen statt an der Wirtszelle binden (Ofek et al. 1977; Ofek et al. 2003)

Auch Pektin führte zu einer signifikanten Reduktion der infizierten Zellen. Allerdings kam es auch zu einer nicht signifikanten Erhöhung der infizierten Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle um 18 % bzw. 12 % in den Konzentrationen 0,1 g/l und 0,001 g/l. Die antiadhäsive Wirkung scheint in den Typ1-Fimbrien der *E. coli* zu liegen, die in diesem Falle an den sauren Oligosacchariden des Pektins binden (Jugl et al. 2001; Kastner et al. 2002).

Durch den Einfluss von Fresta F[®] reduzierte sich die Menge der infizierten Zellen signifikant um 41,8 % (10 g/l). In Konzentrationen von 0,1 g/l und der 0,01 g/l Fresta F[®] erhöhte sich die Menge der fluoreszierenden Zellen numerisch um 19 % bzw. 12 %. Bereits in einer vorangegangenen Studie wurde der Einfluss des Futteradditivs Fresta F[®] *in vitro* bezüglich der Adhäsion zwischen *Escherichia coli* und einer Zelllinie getestet. Die eingesetzte Konzentration betrug 0,33 % und führte zu einer signifikanten Reduktion der Fluoreszenz um 52,7 % im Vergleich zur Positivkontrolle (Gärtner 2011).

Bei Sulforaphan (1,3 mg/l) kam es zu einer signifikanten Reduktion der infizierten Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle. Die antibakterielle Aktivität von Sulforaphan wurde in einer Studie nachgewiesen. Das Sulforaphan beeinflusste die Membrandurchlässigkeit der *E. coli*-Bakterien, zerstörte diese allerdings nicht direkt (Wu et al. 2012). In einer weiteren Studie wurde die inhibitorische Wirkung verschiedener Hydrolyseprodukte aus Glucosinolaten bezüglich des Wachstums verschiedener Enterobakteriaceen im Vergleich zu einer Antibiotikakontrolle getestet. Auch hier zeigte Sulforaphan in einer Konzentration von 0,15 – 3 µmol eine hemmende Wirkung (Saavedra et al. 2012). Neben einer weiteren Studie, in der die antimikrobielle Aktivität des Sulforaphans nachgewiesen wurde (Aires et al. 2009), gibt es zahlreiche Studien über antikanzerogene Wirkungen des Sulforaphans und diesbezüglich viele Zellkulturversuche. Antiadhäsive Effekte von Sulforaphan wurden bislang offenbar nicht publiziert.

Bei Glucoraphanin (0,16 mg/l) erhöhte sich die Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Positivkontrolle in der Tendenz um 25 %. Bislang gibt es keine Studien über die antiadhäsive Wirkung von Glucoraphanin. Es liegt eine Studie zur antimikrobiellen Aktivität flüchtiger Bestandteile, welche aus einer *Aurinia leucadea*-Pflanze (Brassicaceae) extrahiert wurden und die Glucoraphanin enthielt, vor Blazevic et al. (2011). Zahlreiche Studien über *in vitro*-Untersuchungen liegen bezüglich der antikanzerogenen Wirkung des Glucoraphanins vor.

Alle eingesetzten Testsubstanzen zeigten keine konzentrationsabhängigen Effekte. Bei allen Substanzen bewirkte jedoch die höchste eingesetzte Konzentration die stärkste Hemmung der Infektion.

5.3. Fütterungsversuch

5.3.1. Versuchsbedingungen

Die Ferkel wurden mit 28 Tagen im Erzeugerbetrieb abgesetzt und dann anschließend im Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin eingestallt. Pro Gruppe wurden jeweils 12 Ferkel eingestallt, je 6 weibliche und 6 männliche kastrierte Ferkel. Der absetzbedingte als auch der Transportstress waren vermutlich ursächlich für eine fehlende bzw. sehr geringe Futteraufnahme in den ersten Versuchstagen, weswegen die Ferkel mit Einweichen des Futters mit Wasser zum Fressen animiert werden mussten. Anschließend fraßen alle Ferkel problemlos.

5.3.2. Zootechnische Parameter

Die drei Versuchsdiäten zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Einfluss auf die Lebendmassezunahme. Die erste Woche kann als Umstellungsphase der Ferkel angesehen werden, da besonders in den ersten Tagen teilweise keine bzw. eine sehr geringe Futteraufnahme stattgefunden hat. Dieses wird kurz nach dem Absetzen häufig beobachtet (Le Dividich und Sève 2000).

Zwischen den Versuchsgruppen gab es keine Unterschiede der Futteraufnahme in den vier Versuchswochen. Es gibt zahlreiche Studien mit phytoenen Zusatzstoffen, welche sowohl positive, negative oder keine Effekte auf zootechnische Parameter belegen. Im Folgenden wird nur auf Untersuchungen Bezug genommen, welche Additive mit den in den Fütterungsversuchen verwendeten Substanzen bzw. Hauptinhaltsstoffen untersuchten. Ein Vergleich der Fütterungsstudien mit polyphenolreichen Zusätzen ist schwierig, da selten eine Analyse der vorliegenden Polyphenole noch eine quantitative Bestimmung des Polyphenolgehalts durchgeführt wurde.

In einer Untersuchung mit früh abgesetzten Ferkeln wurden drei verschiedene Konzentrationen (0,1 - 0,3 %) von Galaktomannan-Oligosacchariden, welche aus dem Harz von Pflanzen der Gattung *Sesbania* isoliert wurden, verabreicht. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen festgestellt. Jedoch war der Futteraufwand in der Gruppe, die 0,2 %-Galaktomannan-Oligosaccharide bekam tendenziell niedriger ($p = 0,07$) (Wang et al. 2010). In einer Studie mit Ratten, die 12 Wochen lang Bockshornkleesamen in drei verschiedenen Konzentrationen (0,25 - 0,75 %) erhielten, kam es zu einer signifikanten Zunahme der Lebendmasse. Es wurde beobachtet, dass die Lebendmassezunahme proportional zur Konzentration des verfütterten Bockshornkleesamens anstieg (Elmnan et al. 2012).

Im Rahmen einer Studie mit Bockhornkleesamen (0,15 %) und Fresta F[®] (0,04 %; 0,2 %) mit Absetzferkeln wurden keine Unterschiede bei Lebendmasse, Lebendmassezunahme und Futteraufwand festgestellt. Lediglich die Futteraufnahme war in der Bockhornkleegruppe numerisch erhöht (Gärtner 2011). In einer Studie von Cho et al. (2006) wurde der Einfluss von Fresta F Conc.[®] in einer Konzentration von 0,03 % an Absetzferkeln getestet. Die Futteraufnahme war dabei signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings konnten in der Lebendmassezunahme sowie im Futteraufwand keine Unterschiede festgestellt werden. Diese Ergebnisse werden durch eine Fütterungsstudie von (Wetscherek 2005) teilweise bestätigt. In dieser Studie bekamen Ferkel in der Absetzphase 0,2 % Fresta F[®] und in der Aufzuchtphase 0,02 % Fresta F Conc.[®] verabreicht. Während der Absetzphase hatte die Verfütterung eine signifikante Erhöhung der Futteraufnahme sowie eine numerisch erhöhte Lebendmassezunahme zur Folge. In der Aufzuchtphase konnten der Futteraufwand ($p = 0,07$) und die Futteraufnahme ($p = 0,08$) ebenfalls gesteigert werden.

Der Einfluss von polyphenolreichem Holundertrester wurde im Hinblick auf die Leistungsparameter und den antioxidativen Status bei früh abgesetzten Ferkeln getestet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Futteraufnahme oder der täglichen Lebendmassezunahme festgestellt werden. Der Futteraufwand wurde durch den Holundertrester nicht beeinflusst (Blank und Wolfram 2010). Ein polyphenolreicher, mit *Saccaromyces boulardii* fermentierter Traubentrester wurde an Läufer verfüttert, um den Einfluss des Tresters auf die Leistung und verdauungsphysiologische Parameter zu drei verschiedenen Alterszeitpunkten zu ermitteln. Es wurden signifikante Unterschiede bei der täglichen Lebendmassezunahme sowie dem Futteraufwand im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (Yan und Kim 2011). In einem weiteren Fütterungsversuch wurde ein polyphenolreiches Traubentresterkonzentrat in drei verschiedenen Konzentrationen (15 – 60 g/kg) an Broiler verfüttert. Zusätzlich enthielt die Ration jeweils 200 mg/kg α -Tocopherol. Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der Lebendmassezunahme und Futteraufnahme gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden (Brenes et al. 2008). Der Einfluss von einem polyphenolreichen Traubenkernextrakt in verschiedenen Konzentrationen (0,025 - 5,0 g/kg) hinsichtlich der Leistungsparameter von Broilern wurde in einer weiteren Studie untersucht. Hier zeigten sich keine Unterschiede in den Leistungsdaten zwischen den Fütterungsgruppen (Chamorro et al. 2013). Der Einfluss alkoholischer Extrakte aus Propolis wurde in verschiedenen Konzentrationen (50 - 250 mg/kg) an Broiler bezüglich der Leistungsdaten getestet. Durch die Zugabe des Extraktes wurde eine Erhöhung der Lebendmassezunahme und der Futteraufnahme festgestellt. Durch Zugabe von 250 mg/kg Propolisextrakt wurde zudem der Futteraufwand signifikant erniedrigt (Khojasteh Shalmany 2006). Durch einen Extrakt aus Granatapfel, der an Kälber in den ersten 70 Lebenstagen verfüttert wurde, konnte nach dem 30. Tag eine Reduktion der Lebendmassezunahme und der Futteraufnahme festgestellt werden. In den ersten 30 Tagen hatte der Extrakt allerdings keinen Einfluss auf die Leistungsparameter (Oliveira et al. 2010).

5.3.3. Verdauungsphysiologische Parameter

5.3.3.1. Scheinbare Gesamtverdaulichkeit

Die Gesamtverdaulichkeit von Threonin, Valin, Isoleucin und Lysin war in der Apfelextraktgruppe signifikant höher verglichen mit den anderen drei Fütterungsgruppen. Die Gesamtverdaulichkeit der Aminosäuren Leucin und Tyrosin war in der Apfelextraktgruppe signifikant höher als in den Fütterungsgruppen B (Bockshornkleesamen) und C (Fresta F[®]).

Obwohl Bockshornklee und Bockshornkleesamen in vielen Studien von großem Interesse bezüglich unterschiedlichster Aspekte sind, liegen bisher nur sehr wenige Studien zu möglichen Effekten von Bockshornkleesamen auf die Nährstoffverdaulichkeit vor. In einer Fütterungsstudie mit Absetzferkeln, die über vier Versuchswochen 1,5 g Bockshornkleesamen pro kg Futter verabreicht bekamen, wurden keine Unterschiede bezüglich der Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt (Gärtner 2011).

In der oben genannten Studie wurde auch das Fresta F[®] in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,2 % und 0,04 %) an Absetzferkel verfüttert. Es wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins ermittelt (Gärtner 2011). In einer Studie mit Ratten im Absetzalter wurden drei verschiedene Konzentrationen (5 % - 20 %) Bockshornkleesamen an männliche und weibliche Tiere verfüttert. Die Ermittlung der Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins sowie der Trockensubstanz ergab keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern, allerdings korrelierten die Gesamtverdaulichkeiten negativ mit der Konzentration der Bockshornkleesamen (Rao et al. 1996), was in vorangegangenen Publikationen ermittelt wurde (Rao und Sharma 1987; Rao und Sharma 1989).

Die Gesamtverdaulichkeit verschiedener Nährstoffe durch die Zugabe von polyphenolhaltigen Pflanzen und Futterzusätzen wurde in einigen Studien an Ferkeln ermittelt (Kotrotsios et al. 2010; Oliveira et al. 2010; Yan und Kim 2011). Bei der Zugabe von Johannesbrotschalen an Schweine wurde eine signifikante Reduktion der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit der Trockensubstanz, des Rohproteins, der Rohfaser und der Aminosäuren verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt. Dabei korrelierte die Reduktion der Gesamtverdaulichkeit negativ mit dem Gehalt der Johannesbrotschalen im Futter. Die Autoren führen dies auf den Gehalt an Tanninen zurück, die möglicherweise die Verdauungsenzyme hemmen (Kotrotsios et al. 2010). In der Studie von Yan und Kim (2011) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen hinsichtlich der Gesamtverdaulichkeit der Trockensubstanz, die bei 11 Wochen alten Ferkeln signifikant höher war als in der Kontrollgruppe. Die Gesamtverdaulichkeit des Stickstoffs bei 16 Wochen alten Ferkeln war signifikant erhöht. In der Studie von Oliveira et al. (2010) erzielte die Verfütterung von Granatapfelextrakt keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gesamtverdaulichkeit von Trockensubstanz, organischer Substanz, Rohprotein, Rohfett und Stärke.

5.3.3.2. Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit

Auch bei der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit des Rohproteins wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Fütterungsgruppen festgestellt. Die praecaecale Verdaulichkeit von Valin war in der Fütterungsgruppe B (Bockshornkleesamen) signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Fütterungsgruppe D (Apfelextrakt). Die praecaecale Verdaulichkeit von Isoleucin war in der Fütterungsgruppe D (Apfelextrakt) signifikant höher als in den Fütterungsgruppen B (Bockshornkleesamen) und C (Fresta F®). Dieser Befund dürfte allerdings aufgrund der insgesamt nicht unterschiedlichen scheinbaren Verdaulichkeit des Rohproteins nicht von praktischer Relevanz sein.

Bisherige Studien zeigten unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Verdaulichkeit verschiedener Rohnährstoffe beim Einsatz von Bockshornkleesamen (Nochta et al. 2010; Wang et al. 2010). Die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der Trockensubstanz und der Aminosäuren wurde in einem Fütterungsversuch mit früh abgesetzten Ferkeln ermittelt. Diese Ferkel erhielten ein Futter mit Galaktomannan-Oligosacchariden, die als aktive Hauptkomponenten des Bockshornkleesamens betrachtet werden, in drei verschiedenen Konzentrationen (0,1 - 0,3 %). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen bezüglich der praecaecalen Aminosäurenverdaulichkeit bei Zufütterung von 0,2 % und 0,3 % Galaktomannan-Oligosacchariden festgestellt. Lediglich bei einigen Aminosäuren war die praecaecale Verdaulichkeit bei Zufütterung von 0,1 % Galaktomannan-Oligosacchariden erhöht im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Wang et al. 2010). In einem ähnlichen Versuchsaufbau bekamen Absetzferkel drei verschiedene Konzentrationen (1 - 4 g/kg) an Mannan-Oligosacchariden gefüttert. Die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der Trockensubstanz war bei Zusatz von 2 g/kg höher als in der Kontrollgruppe, auch für das Rohprotein ergaben sich nach Zulagen von 2 bzw. 4 g/kg eine höhere scheinbare Verdaulichkeit (Nochta et al. 2010).

Auch der Einsatz von Polyphenolen war Gegenstand einiger Studien (Muhl und Liebert 2007; Brenes et al. 2008). Muhl und Liebert (2007) ermittelten keine Unterschiede der praecaecalen Verdaulichkeit des Rohproteins und einiger ausgewählter Aminosäuren zwischen den Polyphenolgruppen und der Kontrollgruppe. Dieses wurde in einer Studie von Brenes et al. (2008) bestätigt. Im Gegensatz dazu erhöhte die Zugabe eines polyphenolreichen Traubenkernextrakts in der oben genannten Studie von Chamorro et al. (2013) die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit des Rohproteins. Ein konzentrationsabhängiger Effekt war hier nicht feststellbar

5.3.4. Biochemische Parameter

5.3.4.1. Aktivität verschiedener intestinaler Enzyme

Die Aktivität der intestinalen alkalischen Phosphatase zeigte tendenzielle Unterschiede ($p = 0,057$) zwischen den Fütterungsgruppen, die Aktivität in der Fütterungsgruppe Bockshornkleesamen war gegenüber der Gruppe Fresta F[®] höher. Die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase der anderen Gruppen zeigten eine numerische Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe. Die Aktivitäten der Aminopeptidase N zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, jedoch war sie in der Bockshornkleesamen-Gruppe numerisch erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Ebenfalls nur numerisch ausgeprägt war die Reduktion der Laktase- und Maltaseaktivität der Gruppe Fresta F[®] gegenüber der Kontrollgruppe. Auch die Maltaseaktivität der Bockshornkleegruppe war numerisch reduziert gegenüber der Kontrollgruppe. Die Saccharaseaktivitäten zeigten keinerlei Unterschiede zwischen den vier Fütterungsgruppen. Insofern legen diese Ergebnisse nahe, dass die getesteten Substanzen keinen Effekt auf die gemessenen Enzymaktivitäten zeigten.

Es gibt bisher nur wenige Fütterungsversuche mit Bockshornklee bzw. Bockshornkleesamen und deren Einfluss auf intestinale Enzymaktivitäten vor. In einer Studie mit Ratten wurden verschiedene Gewürze über einen Zeitraum von sechs Wochen verfüttert und anschließend die Aktivität spezifischer Verdauungsenzyme ermittelt. Bockshornklee wurde in einer 2%igen Konzentration an Ratten verfüttert. Eine signifikante Reduktion der Aktivität der alkalischen Phosphatase und Saccharase wurde beobachtet. Die Aktivität der Enzyme Maltase, Laktase und der sauren Phosphatase wurde nicht beeinflusst (Platel und Srinivasan 1996). In einer Fütterungsstudie, die an diabetischen Ratten durchgeführt wurde, wurde der Einfluss von Galaktomannanen aus Bockshornklee auf die Aktivität intestinaler Verdauungsenzyme getestet. Die Galaktomannane senkten die Aktivitäten der Laktase, Maltase und Saccharase signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ab, das Enzymniveau entsprach demjenigen der gesunden Kontrollgruppe. Enzymhemmende Wirkungen der Galaktomannane wurden bereits in anderen Studien beobachtet (Hamden et al. 2010). Auch in einer *in vitro*-Untersuchung senkte 1 mg/ml Bockshornklee die Aktivität der Disaccharidasen Laktase und Maltase signifikant, jedoch nicht die der Saccharase. In geringerer Konzentration bestand kein Einfluss auf die Disaccharidasen (Ramakrishna Rao et al. 2003).

Auch polyphenolreiche Extrakte wurden verschiedentlich getestet, insbesondere im Hinblick auf die Aktivität von Pankreasenzymen. Kondensierte Tannine aus der Ackerbohne wurden in einer Konzentration von 200 g/kg an Absetzferkel verfüttert. Die Diäten beinhalteten entweder 0,1 % oder 3,3 % kondensierte Tannine. Beide Rationen hatten keinen Einfluss auf die Aktivität der Saccharase, allerdings hatte das Futter mit dem hohen Tanningehalt einen signifikant hemmenden Effekt auf die Aktivität der Aminopeptidase im Vergleich zur Kontrolle (Vanleeuwen et al. 1995). Ein gefriergetrocknetes polyphenolreiches Pulver aus dem Saft von *Viburnum dilatatum* wurde an Ratten oral verabreicht, die an einem induzierten Diabetes litten. In einer Konzentration von 2 g/kg zeigten sich die Aktivitäten der Disaccharidasen Saccharase und Maltase in ihrer Aktivität gehemmt (Iwai et al. 2006). Diäten, die 20 %

Yamswurzeln enthielten, erhöhten demgegenüber die Aktivitäten von Maltase und Saccharase bei Mäusen (Hsu et al. 2006).

Die Versuchsanstellungen sind insgesamt betrachtet kaum vergleichbar, sodass keine eindeutigen Aussagen zur Wirksamkeit von Polyphenolen bezüglich einer Erhöhung oder Reduktion der Aktivität von ausgewählten intestinalen Enzymen gemacht werden können.

5.3.4.2. Antioxidative Kapazität

Die antioxidative Kapazität im Plasma, die mittels FRAP- und TEAC-Assay ermittelt wurde, unterschied sich nicht signifikant zwischen den vier Versuchsgruppen. Zum antioxidativen Potenzial des kommerziellen Ferkelfutters Fresta F[®] liegen keine Studien vor.

Es gibt einige *in vivo*-Studien zum antioxidativen Potenzial von Bockshornkleesamen. Der Einfluss von Bockshornkleesamen wurde auch an diabetischen und gesunden Ratten getestet. Durch Zugabe von Bockshornkleesamen zeigten die gesunden Tiere einen signifikant erhöhten Gehalt an Ascorbinsäure, Glutathion und beta-Carotinen im Blut nach 30 Tagen verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe (Ravikumar und Anuradha 1999). Eine weitere Studie testete einen alkoholischen Extrakt aus Bockshornkleesamen in einer Konzentration von 200 mg/kg Körpermasse an Ratten, die entweder durch eine Diät mit einem sehr hohen Fettanteil oder durch Tritonbehandlung in einen hyperlipidämischen Zustand versetzt wurden. Erhöhte TBARS-Werte in der Gruppe, die mit der fetthaltigen Diät gefüttert worden war, konnten durch die Zugabe des Bockshornkleesamenextraktes reduziert werden. Auch die Aktivitäten der Superoxiddismutase und der Katalase wurden durch den hohen Fettanteil der Diät stark erhöht und durch Zugabe des Extraktes auf das Niveau der Negativkontrolle reduziert (Chaturvedi et al. 2013). Ein wässriger Extrakt aus Bockshornkleesamen, der in verschiedenen Konzentrationen (440 - 1740 mg/kg Futter) diabetischen Ratten verabreicht wurde, hatte einen signifikanten antioxidativen Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Xue et al. 2011). Die genannten Studien unterscheiden sich im Versuchsaufbau von den eigenen Untersuchungen, sodass direkte Vergleiche wiederum nur eingeschränkt möglich sind. Möglicherweise ist der geringe Gehalt an Bockshornkleesamen in der Ferkelration (2 g/kg Futter) ursächlich für die fehlenden antioxidativen Wirkungen. Weiterhin könnten auch tierartige und diätetische Effekte ursächlich infrage kommen, da die verwendeten Versuchsfutter nur vergleichsweise geringe Fettgehalte aufwiesen.

Das antioxidative Potenzial von Polyphenolen wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Wollgast und Anklam 2000; Koncic et al. 2010; Procházková et al. 2011). Die antioxidative Kapazität wurde auch in einigen Fütterungsversuchen bestätigt. An Legehennen wurden aus Zitrone und Grapefruit gewonnene Inhaltsstoffe, Hesperetin, Naringenin und Pektin, verfüttert und anschließend die antioxidative Kapazität des Blutes ermittelt. Die Verabreichung von Naringenin zeigte bei der Messung der Superoxiddismutase, des TEAC-Werts sowie der TBARS signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lien et al. 2008). In einer Fütterungsstudie mit Resveratrol, das in zwei verschiedenen Konzentrationen (200 und

400 mg/kg Futter) an Wachteln verfüttert wurde, wurde der Gehalt an Malondialdehyd (MDA) im Blut ermittelt. Bei einer Zugabe von 400 mg Resveratrol/kg Futter konnte eine Verbesserung des antioxidativen Status festgestellt werden. Mit ansteigendem Gehalt des Resveratrols sank der Gehalt des MDA (Sahin et al. 2010). In anderen Fütterungsversuchen konnte eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität durch Verfütterung von Polyphenolen nicht bestätigt werden. In einer Studie wurde Schweinen ein Extrakt aus grünem Tee in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 und 100 mg/kg Körpermasse) verfüttert. Anschließend konnten keine signifikanten Unterschiede der antioxidativen Kapazität im Plasma mittels des FRAP- und TEAC-Assays zwischen den Fütterungsgruppen ermittelt werden (Augustin et al. 2008). Eine weitere Studie befasste sich mit der Zugabe von 10 mg Quercetin/kg Körpermasse mit oder ohne Zugabe von Fischöl an Schweine. Die Ermittlung der antioxidativen Kapazität erfolgte durch TBARS und das FRAP-Assay. Es konnten keine Veränderungen durch die Verfütterung von Quercetin festgestellt werden (Luehring et al. 2011). Ursächlich für diese Ergebnisse könnte die Art der Messmethode sein, da physiologische Antioxidantien wie Urat oder Ascorbinsäure an der antioxidativen Kapazität des Plasmas beteiligt sind. Auch ist es möglich, dass die antioxidative Kapazität des Plasmas durch Futtermittel beeinflusst werden könnte, die keine antioxidativen Eigenschaften aufweisen, aber die Aufnahme, Gewebemobilisation oder den Metabolismus von exo- und endogenen Antioxidantien beeinflussen (Lotito und Frei 2006). In der bereits beschriebenen Studie von Brenes et al. (2008) konnten ebenfalls keine Veränderungen der antioxidativen Kapazität im Serum festgestellt werden. Auch die Verabreichung der Flavonoide Genistein, Quercetin und Catechin, einzeln oder in Kombination in einer Gesamtkonzentration von 2 g an Flavonoide/kg Futter hatte keinen Einfluss auf die antioxidative Kapazität im Plasma von Ratten, welche mithilfe des FRAP-Assays ermittelt wurde (Wiegand et al. 2010).

5.3.5. Elektrophysiologische Untersuchungen in der Ussingkammer

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen am Jejunumgewebe wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Fütterungsgruppen auf. Der I_{sc}-Wert war nach der Zugabe von Glukose in der Fütterungsgruppe Apfelextrakt nur numerisch erhöht gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Zahl an Studien mit Fütterungsversuchen, in denen gleichzeitig elektrophysiologische *ex vivo* Messungen in der Ussingkammer durchgeführt wurden, ist gering.

Quinoahüllen, die einen hohen Saponingehalt aufweisen, wurden in drei Konzentrationen (100; 300; 500 mg/kg Futter) an Schweine verfüttert. Anschließend wurde Darmgewebe vergleichend zur Kontrollgruppe elektrophysiologisch in der Ussingkammer untersucht. Der I_{sc}-Wert war nach Glukosezugabe in der Fütterungsgruppe, die 100 mg/kg Futter Quinoa verfüt

tert bekam, nicht erhöht ($p = 0,11$) (Carlson et al. 2012). Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss von drei unterschiedlich behandelten Saponinextrakten aus der Sojabohne auf die elektrophysiologischen Parameter des Schweinedarms. Der Darm wurde mit den Saponinextrakten (roh, erhitzt oder mit Ethanol behandelt und erhitzt) inkubiert und die Glukoseabsorption ermittelt. Die natriumabhängige Glukoseabsorption war unter dem Einfluss des rohen Saponinextraktes signifikant erniedrigt. Die anderen Extrakte hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Glukoseabsorption (Boudry et al. 2003).

Der Einfluss von Polyphenolen hinsichtlich des Glukosetransportes im Schweinedarm wurde ebenfalls nur *in vitro* untersucht. In einer Studie wurde porcines Jejunumgewebe mit verschiedenen Konzentrationen von Thymol oder Trans-Zimtaldehyd inkubiert. Nach der Zugabe von 16 mmol/l Glukose wurde die Veränderung des Isc-Wertes gemessen. Es zeigte sich eine signifikante und dosisabhängige Reduktion des Isc-Wertes durch den Einfluss beider eingesetzter Substanzen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Michiels et al. 2010). Diese Ergebnisse bestätigen die numerisch erhöhten Isc-Werte der Fütterungsgruppe Apfelextrakt nicht. Allerdings sind die Daten aus *in vitro* und *ex vivo* Untersuchungen nur schwerlich vergleichbar. Andere Studien bezüglich des Einflusses von Polyphenolen auf die natriumabhängige Glukoseabsorption im Darmgewebe liegen offenbar nicht vor.

5.3.6. Molekularbiologische Parameter

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen zur Genexpression der Enzyme Laktase-Phlorizin-Hydrolase und Aminopeptidase und dem natriumabhängigen Glukosetransporter-1 wiesen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen auf. Allerdings zeigten sich signifikante Reduktionen der Saccharaseexpression in den Fütterungsgruppen Bockshornkleesamen und Fresta F[®] im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bislang gibt es kaum Studien zur Genexpression spezifischer Verdauungsenzyme.

In einer Studie wurde der Einfluss des Absetzens und antioxidativer Substanzen auf die Aktivität spezifischer Verdauungsenzyme und deren Genexpression bei Ferkeln getestet. Die Ferkel wurden entweder mit Muttermilch, mit einer Basaldiät oder einer Basaldiät mit antioxidativen Zusätzen ernährt. Die antioxidativen Zusätze beinhalteten Vitamin C und E, Teepolyphenole, Bierhefe und durch *Bacillus* sowie *Lactobacillus* fermentierte mikrobielle Antioxidantien. Die Werte der Gruppe, die mit antioxidativen Substanzen gefüttert wurde, wiesen eine signifikante Erhöhung der Aktivität der Maltase im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Basaldiät). Die Saccharaseexpression war in der Fütterungsgruppe mit Antioxidanzienzusatz signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) (Zhu et al. 2012).

In einer weiteren Studie wurde Mäusen Quercetin in einer Konzentration von 0,5 % über vier Wochen im Futter verabreicht. Die Expression des natriumabhängigen Glukosetransporter-1 war bei den mit Quercetin gefütterten Mäusen signifikant erhöht (Barrenetxe et al. 2006).

Um ursächliche Vermutungen bezüglich des Einfluss von Bockshornkleesamen und Polyphenolen auf die Genexpression der getesteten Enzyme bzw. Nährstofftransporter anstellen zu können, wären weitere Untersuchungen hinsichtlich der gemessenen Zielgene sinnvoll.

5.4. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen zeigen mögliche Wirkmechanismen phytogener Substanzen bzw. phytogener Futterzusatzstoffe auf die Adhäsion pathogener *E. coli*. Eine Überprüfung der *in vitro*-Ergebnisse in einem geeigneten *in vivo*-Infektionsmodell wäre wünschenswert. Die Ergebnisse des Fütterungsversuches zeigten keine signifikanten Veränderungen der gemessenen Parameter durch den Zusatz der getesteten Futterzusätze.

6. Zusammenfassung

Der Einfluss phytogener Futterzusatzstoffe auf die Nährstoffverdaulichkeit und Aktivität verschiedener intestinaler Enzyme sowie Expression von Nährstofftransportern bei Absetzferkeln

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss eines phytoenen Futterzusatzstoffes, zweier polyphenolreicher Apfelextrakte sowie vier phytoener Substanzen auf die Adhäsion zwischen einem enteropathogenen *Escherichia coli*-Stamm und der intestinalen porcinen epithelialen Zelllinie IPEC-J2 *in vitro* getestet.

Weiterhin wurden in einem Fütterungsversuch 24 weibliche und 24 kastrierte männliche abgesetzte Ferkel im Alter von 28 Tagen in zwei aufeinanderfolgenden Versuchsreihen auf vier Fütterungsgruppen aufgeteilt. Das Ferkelaufzuchtfutter enthielt in der Kontrollgruppe 0,2 % Weizenkleie. Der Versuchsgruppe B wurde 0,2 % der Gruppe C 0,2 % des phytoenen Ferkelfutters Fresta F und der Versuchsgruppe D 0,2 % eines polyphenolreichen Apfelextraktes hinzugefügt. Einmal wöchentlich erfolgte die Erhebung der zootecnischen Daten. An den Versuchstagen 25 – 28 wurden die Tiere zur Probenentnahme euthanasiert und Blut-, Kot-, Urin-, Digestaprobe aus dem Ileum sowie Gewebeprobe aus dem Jejunum entnommen. Zusätzlich zu den Leistungsdaten wurde die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit und die Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins sowie der Aminosäuren ermittelt. Aus Gewebeprobe des Jejunums wurden die Bürstensaummembranen isoliert, aus denen anschließend der Proteingehalt sowie die Aktivitäten der intestinalen Enzyme Saccharase, Maltase, Laktase, Aminopeptidase N und der alkalischen Phosphatase bestimmt wurden. Jejunumprobe wurden auch zur Bestimmung der Genexpression der intestinalen Enzyme Saccharase, Maltase, Laktase, Aminopeptidase N sowie des natriumabhängigen Glukosetransporters-1 (SGLT-1) herangezogen. Weiterhin wurden elektrophysiologische Messungen am Jejunum in Ussing-Kammern durchgeführt. Die antioxidative Kapazität des Blutplasmas wurde mithilfe des FRAP- und des TEAC-Tests aus dem Plasma bestimmt.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen zeigten signifikante Reduktionen der Adhäsion der *E.coli*-Bakterien an den IPEC-J2-Zellen durch Zugabe von Bockshornkleesamen, Pektin, der beiden Apfelextrakte und des Zusatzes Fresta F[®]. Die phytoenen Substanzen Glucoraphanin und Sulforaphan bewirkten keine signifikante Reduktion der Adhäsion. Die Ergebnisse des Fütterungsversuchs zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Leistungsparameter. Die praecaecale Verdaulichkeit der Aminosäure Valin erhöhte sich in der Bockshornkleegruppe verglichen mit der Kontrollgruppe und der Fütterungsgruppe D (Apfelextrakt). Die praecaecale Verdaulichkeit von Isoleucin erhöhte sich in der Fütterungsgruppe D (Apfelextrakt) verglichen mit den Fütterungsgruppen B (Bockshornkleesamen) und C (Fresta F[®]). Die Gesamtverdaulichkeit der Aminosäuren Threonin, Valin, Isoleucin und Lysin erhöhte sich der Apfelextraktgruppe gegenüber den anderen drei Versuchsgruppen. Die Gesamtverdaulichkeit von Leucin und Tyrosin erhöhte sich ebenfalls in der Apfelextraktgruppe verglichen mit den Fütterungsgruppen B und C. Der Zusatz der phytoenen Futterzusatzstoffe hatte keinen Einfluss auf die Aktivitäten der intestinalen Enzyme Laktase, Maltase, Saccharase, Aminopeptidase N und der alkalischen Phosphatase. Auch die antioxidative Kapazi-

Zusammenfassung

tät im Blutplasma wurde durch die Futterzusätze nicht beeinflusst. Die elektrophysiologischen Messungen in der Ussingkammer zeigten keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Die Ermittlung der Genexpression mithilfe der PCR zeigte eine Verringerung der Expression der Saccharase in den Fütterungsgruppen B (Bockshornkleesamen) und C (Fresta F[®]) verglichen mit der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss auf die Adhäsion von *E. coli* und der IPEC-J2-Zelllinie für weiterführende Studien interessant sein könnte. Ein Einsatz entsprechender Zusatzstoffe könnte zur Vorbeugung bakterieller Durchfallerkrankungen in der Absatzphase bei Ferkeln sinnvoll sein.

7. Summary

Influence of phytogetic feed additive on the digestibility and the activity of some intestinal enzyme and genexpression of nutrient transporters in weaning piglets

In the present study, the influence of a phytogetic feed additive, two polyphenol-rich apple extracts and four phytogetic substances on the adhesion between an enteropathogenic *E. coli* and an IPEC-J2-cell line was examined.

In a feeding trial, 24 female and 24 castrated male piglets (weaned at the age of 28 days) were assigned to four feeding groups in two successive series of experiments. The starter diet contained 0.2 % wheat bran in the control group A, 0.2 % fenugreek seeds in group B, 0.2 % of the phytogetic feed additive Fresta F[®] in group C and 0.2 % of a polyphenol-rich apple extract in group D. The zootechnical data were determined once a week. After a feeding period of four weeks, the piglets were euthanized and samples of blood, urine, digesta of the ileum and tissues of the jejunum were collected. In addition to the performance data, the apparent ileal digestibility and the total digestibility of crude protein as well as amino acids was determined. The tissues of the jejunum were used to isolate the brush border membranes to determine content of protein and the activity of the intestinal enzymes maltase, sucrase, Laktase, aminopetidase n and the alkaline phosphatase. The gene expression of the intestinal enzymes maltase, sucrase, Laktase, aminopetidase n and the alkaline phosphatase and the sodium-glucose transporter (SGLT-1) were determined in the tissue of the jejunum. Furthermore, electrophysiological measurements of jejunal tissues were conducted in the Ussing chamber. The antioxidative capacity of the blood plasma was established with the FRAP- and the TEAC-Assay.

The results of the *in vitro* investigations showed significant reductions of the adhesion between *E.coli* and IPEC-J2-cells by addition of the Fresta F[®], fenugreek seeds, pectin and both apple extracts. There was no significant reduction of the adhesion when using Glucoraphanin and Sulforaphan. The results of the feeding trial did not show any significant differences between the feeding groups in regard to the performance data. The analyses of the ileal digestibility of the amino acid valine in group B (fenugreek seeds) showed a significant decrease compared to the groups A (control) and D (apple extract). The ileal digestibility of isoleucine showed a significant increase in group D (apple extract) compared to group B (fenugreek seeds) and C (Fresta F[®]). The analyses of the total digestibility of the amino acids threonine, valine, isoleucine and lysine showed a significant increase in group D compared to the three other groups. The total digestibility of leucine and thyrosine showed a significant increase in group D compared to groups B and C. The additions of the phytogetic feed additives did not have any influence on the activities of the intestinal enzymes Laktase, maltase, sucrase, aminopeptidase n and the alkaline phosphatase. The feed additives did not influence the antioxidative capacity of the blood plasma either. The electrophysiological measurements in the Ussing chamber also did not show any differences between the feeding groups. The determination of the gene expression using PCR showed a reduction of the

Summary

gene expression of succrase in the treatment group B (fenugreek seeds) and C (Fresta F[®]) compared to the control group.

The results assumed that the influence on the adhesion between *E. coli* and IPEC-J2 could be of interest for further investigations. The use of appropriate additives could be useful for the prevention of bacterial diarrhea in weaning piglets.

Literaturverzeichnis

Abbas, R. J. (2010):

Effect of using fenugreek, parsley and sweet basil seeds as feed additives on the performance of broiler chickens.

International Journal of Poultry Science 9(3), 278-282.

Aires, A.; Mota, V. R., et al. (2009):

The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract.

Journal of Applied Microbiology 106(6), 2086-2095.

Akroum, S.; Bendjeddou, D., et al. (2009):

Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*.

American-Eurasian Journal of Scientific Research 4(2), 93-96.

Al-Habori, M.; Raman, A., et al. (2001):

In vitro effect of fenugreek extracts on intestinal sodium-dependent glucose uptake and hepatic glycogen phosphorylase A.

International Journal of Diabetes Research 2(2), 91-9.

Al-Habori, M.; Roman, A. (2002):

Pharmacological properties in fenugreek - The genus *Trigonella*.

London und New York: Taylor und Francis.

Augustin, K.; Blank, R., et al. (2008):

Dietary green tea polyphenols do not affect vitamin E status, antioxidant capacity and meat quality of growing pigs.

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 92(6), 705-711.

Barrenetxe, J.; Aranguren, P., et al. (2006):

Effect of dietary quercetin and sphingomyelin on intestinal nutrient absorption and animal growth.

British Journal of Nutrition 95(3), 455-61.

Barth, S. W.; Faehndrich, C., et al. (2007):

Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(4), 1181-1187.

Basch, E.; Ulbricht, C., et al. (2003):

Therapeutic applications of fenugreek.

Alternative Medicine Review 8(1), 20-7.

Basu, T. K.; Srichamroen, A. (2010):

Chapter 28 - Health benefits of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* leguminose).

In: Bioactive foods in promoting health. / Hrsg. W. Ronald Ross and R. P. Victor: Academic Press S. 425-435.

- Batista, L.; Garcia, E., et al. (2007):
Flavonoids and mannanoligosaccharides in broiler diets.
Brazilian Journal of Poultry Science 9, 33-37.
- Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. (1996):
The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay.
Analytical Biochemistry 239(1), 70-76.
- Berschneider, H. M. (1989):
Development of normal cultured small intestinal epithelial cell lines which transport Na and Cl.
9th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association.
- Bieger, J. (2007):
Verteilung des Flavonols Quercetin in Organen und Geweben beim Schwein nach mehrwöchiger Verabreichung mit dem Futter.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation. S.110
- Bin-Hafeez, B.; Haque, R., et al. (2003):
Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum L.*) extract in mice.
International Immunopharmacology 3(2), 257-65.
- Blank, R.; Wolfram, S. (2010):
Untersuchungen zum Einfluss von Holundertrester auf Wachstum und antioxidative Parameter beim frühabgesetzten Ferkel.
Kiel, Christian-Albrechts-Universität, Abschlussbericht. S.10
- Blazevic, I.; Radonic, A., et al. (2011):
Glucosinolate profiling and antimicrobial screening of *Aurinia leucadea* (Brassicaceae).
Chemistry and biodiversity 8(12), 2310 -2321.
- Böhm, H., Boeing, H., Hempel J.; Raab, B.; Kroke, A. (1998):
Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen.
Zeitschrift für Ernährungswissenschaft 37(2), 147-163.
- Boudry, G.; Lalles, J. P., et al. (2003):
Soyabean impairs Na⁺-dependent glucose absorption and Cl⁻-secretion in porcine small intestine.
Reproduction, Nutrition, Development 43(5), 409-418.
- Bradford, M. M. (1976):
Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding.
Analytical Biochemistry 72(1-2), 248-254.

- Bras, N. F.; Goncalves, R., et al. (2010):
Inhibition of pancreatic elastase by polyphenolic compounds.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(19), 10668-76.
- Brenes, A.; Viveros, A., et al. (2008):
Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens.
Poultry Science 87(2), 307-316.
- Bruins, M. J.; Vente-Spreuwenberg, M. A. M., et al. (2011):
Black tea reduces diarrhoea prevalence but decreases growth performance in enterotoxigenic *Escherichia coli* -infected post-weaning piglets.
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 95(3), 388-398.
- Bustanji, Y.; Issa, A., et al. (2010):
Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by *Rosmarinus officinalis* extract and selected phenolic constituents.
Journal of Medicinal Plants Research 4(21), 2235-2242.
- Carlson, D.; Fernandez, J. A., et al. (2012):
Effects of quinoa hull meal on piglet performance and intestinal epithelial physiology.
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 96(2), 198-205.
- Cazarolli, L. H.; Zanatta, L., et al. (2008):
Flavonoids: prospective drug candidates.
Mini Reviews in Medicinal Chemistry 8(13), 1429-40.
- Chamorro, S.; Viveros, A., et al. (2013):
Effects of dietary grape seed extract on growth performance, amino acid digestibility and plasma lipids and mineral content in broiler chicks.
Animal 7(4), 555-561.
- Chandan, R.; O'Grady, S. M., et al. (1991):
Modulation of Na⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻ transport by carbachol in pig distal jejunum.
European Journal of Pharmacology 193(3), 257-264.
- Chang, E. B.; Musch, M. W., et al. (1991):
Phorbol ester inhibition of chicken intestinal brush-border sodium-proton exchange.
American Journal of Physiology 260(6), C1264-C1272.
- Chaturvedi, U.; Shrivastava, A., et al. (2013):
A mechanism based pharmacological evaluation of efficacy of *Trigonella-foenum graecum* (fenugreek) seeds in regulation of dyslipidemia and oxidative stress in hyperlipidemic rats.
Journal of cardiovascular pharmacology 64(1), 12-21.
- Cho, J. H.; Chen, Y. J., et al. (2006):

Effects of essential oils supplementation on growth performance, IgG concentration and fecal noxious gas concentration of weaned pigs.
Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 19(1), 80-85.

Dahlqvist, A. (1968):
Assay of intestinal disaccharidases.
Analytical Biochemistry 22(1), 99-107.

Darwish, R. M.; Aburjai, T. A. (2010):
Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on *Escherichia coli*.
Bmc Complementary and Alternative Medicine 10.

Deng, Q.; Xu, J., et al. (2010):
Effect of dietary tea polyphenols on growth performance and cell-mediated immune response of post-weaning piglets under oxidative stress.
Archiv of Animal Nutrition 64(1), 12-21.

Dixit, P.; Ghaskadbi, S., et al. (2005):
Antioxidant properties of germinated fenugreek seeds.
Phytotherapy Research 19(11), 977-83.

Ehrenkranz, J. R.; Lewis, N. G., et al. (2005):
Phlorizin: a review.
Diabetes/Metabolism Research and Reviews 21(1), 31-8.

Elmadfa, I.; Koken, M. (1980):
Effect of vitamin E and protein quality on the hemolytic effect of *Trigonella sapogenins* in rats.
Ernährungswissenschaft 19(4), 280-9.

Elmnan, A.; Balgees, A., et al. (2012):
Effect of Fenugreek (*Trigonella foenum greacum*) seed dietary levels on lipid profile and body weight gain of rats.
Pakistan Journal of Nutrition 11(11), 1004-1008.

Ermel, G.; Georgeault, S., et al. (2012):
Inhibition of adhesion of uropathogenic *escherichia coli* bacteria to uroepithelial cells by extracts from cranberry.
Journal of Medicinal Food 15(2), 126-134.

Franz, C.; Baser, K. H. C., et al. (2010):
Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a european perspective. A review. (Special issue: Aromatic plants, spices and volatiles in food and beverages.).
Flavour and Fragrance Journal 25(5), 327-340.

Frey, H. H.; Löscher, W. (2009):
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.
Stuttgart: Enke Verlag.

Gärtner, S. (2011):

Untersuchungen zur Wirkung pflanzlicher Futterzusatzstoffe auf verdauungsphysiologische, mikrobiologische und immunologische Parameter bei Absetzferkeln.
Berlin, Freie Universität Berlin, Dissertation. S.168

Gericke, S.; Kurmies, B. (1952):

Colorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure mit Vanadat-Molybdat.
Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 137(1), 15-22.

Grussu, D.; Stewart, D., et al. (2011):

Berry polyphenols inhibit alpha-amylase *in vitro*: identifying active components in rowanberry and raspberry.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(6), 2324-31.

Gu, Y. Y.; Hurst, W. J., et al. (2011):

Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(10), 5305-5311.

Habermehl, G.; Hammann, P. E., et al. (2008):

Flavonoide

In: Naturstoffchemie. / Hrsg.: Springer Berlin Heidelberg S. 467-503.

Hamden, K.; Jaouadi, B., et al. (2010):

Inhibitory effect of fenugreek galactomannan on digestive enzymes related to diabetes, hyperlipidemia, and liver-kidney dysfunctions.
Biotechnology and Bioprocess Engineering 15(3), 407-413.

Hernandez, F.; Madrid, J., et al. (2004):

Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size.
Poultry Science 83(2), 169-174.

Hsu, C. C.; Huang, Y. C., et al. (2006):

Effect of yam (*Dioscorea alata* compared to *Dioscorea japonica*) on gastrointestinal function and antioxidant activity in mice.
Journal of Food Science 71(7), S513-S516.

Iwai, K.; Kim, M. Y., et al. (2006):

alpha-glucosidase inhibitory and antihyperglycemic effects of polyphenols in the fruit of *Viburnum dilatatum* Thunb.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(13), 4588-4592.

Jan, A. T.; Kamli, M. R., et al. (2010):

Dietary flavonoid Quercetin and associated health benefits—An overview.
Food Reviews International 26(3), 302-317.

Janecki, A.; Conrad, A., et al. (2011):
Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *Pelargonium sidoides* (EPs® 7630) for its activity against group *A-streptococci* adhesion to human HEP-2 epithelial cells.
Journal of Ethnopharmacology 133(1), 147-152.

Jugl, M.; Zitterl-Eglseer, K., et al. (2001):
Carrot pectines for prevention of diarrhea in the rearing of piglets in a field study.
Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere 29(5), 308-312.

Kastner, U.; Glasl, S., et al. (2002):
Acid oligosaccharides as the active principle of aqueous carrot extracts for prevention and therapy of gastrointestinal infections.
Wiener Medizinische Wochenschrift 152(15-16), 379-81.

Kawabata, T.; Cui, M. Y., et al. (2011):
Anti-inflammatory and anti-melanogenic steroidal saponin glycosides from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds.
Planta Medica 77(7), 705-10.

Kelly, G. S. (2011):
Quercetin. Monograph.
Alternative Medicine Review 16(2), 172-94.

Khojasteh Shalmany, S. S., M. (2006):
The effect of diet propolis supplementation on ross broiler chicks performance International Journal of Poultry Science 5, 81-83.

Kobayashi, Y.; Suzuki, M., et al. (2000):
Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(11), 5618-5623.

Koga, K.; Shibata, H., et al. (2006):
Effects of 50% ethanol extract from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on alpha-glucosidase inhibitory activity and the elevation of plasma glucose level in rats, and its active compound.
Journal of Food Science 71(7), S507-S512.

Koncic, M. Z.; Kremer, D., et al. (2010):
Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltingia petraea* (Tratt.) Griseb. flower, leaf and stem infusions.
Food and Chemical Toxicology 48(6), 1537-42.

Kotrotsios, N. V.; Christaki, E. V., et al. (2010):
The effect of dietary carob pods on nutrient digestibility in weaning, growing and fattening periods of pigs.
Journal of Food Agriculture and Environment 8(3-4), 779-782.

Lauber, K.; Richteri, R. (1966):

Kinetische Bestimmung der alkalischen Serum-Phosphatase.
Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie 4(4), 208.

Le Dividich, J.; Sève, B. (2000):
Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet.
Domestic Animal Endocrinology 19(2), 63-74.

Lien, T. F.; Yeh, H. S., et al. (2008):
Effect of adding extracted hesperetin, naringenin and pectin on egg cholesterol, serum traits and antioxidant activity in laying hens.
Archives of Animal Nutrition 62(1), 33-43.

Lotito, S. B.; Frei, B. (2006):
Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?
Free radical biology and medicine 41(12), 1727-46.

Luehring, M.; Blank, R., et al. (2011):
Vitamin E-sparing and vitamin E-independent antioxidative effects of the flavonol quercetin in growing pigs.
Animal Feed Science and Technology 169(3-4), 199-207.

Mader, A. (2011):
Biological effects of industrial plant residues in pigs.
Wien, Veterinärmedizinische Universität, Dissertation. S.143

Maroux, S.; Louvard, D., et al. (1973):
The aminopeptidase from hog intestinal brush border.
Biochimica et biophysica acta - Enzymology 321(1), 282-295.

Michiels, J.; Missotten, J., et al. (2010):
Thymol and trans-cinnamaldehyde reduce active nutrient absorption and chloride secretion in the pig jejunal Ussing chamber model.
Livestock Science 134(1), 27-29.

Middleton, E., Jr.; Kandaswami, C., et al. (2000):
The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.
Pharmacological Reviews 52(4), 673-751.

Miller, N. J.; Sampson, J., et al. (1996):
Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls.
FEBS Letters 384(3), 240-242.

Muhl, A.; Liebert, F. (2007):
No impact of a phytogetic feed additive on digestion and unspecific immune reaction in piglets.

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 91(9-10), 426-31.

Naumann, C.; Bassler, C. (2004):
Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.
Darmstadt: VDLUFA-Verlag.

Naz, S.; Siddiqi, R., et al. (2011):
Epigallocatechin-3-gallate inhibits lactase but is alleviated by salivary proline-rich proteins.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(6), 2734-2738.

Nochta, I.; Halas, V., et al. (2010):
Effect of different levels of mannan-oligosaccharide supplementation on the apparent ileal digestibility of nutrients, N-balance and growth performance of weaned piglets.
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 94(6), 747-756.

Ofek, I.; Hasy, D. L., et al. (2003):
Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems.
Fems Immunology and Medical Microbiology 38(3), 181-191.

Ofek, I.; Mirelman, D., et al. (1977):
Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors.
Nature 265(5595), 623-625.

Oleszek, W.; Stochmal, A., et al. (2007):
Concentration of isoflavones and other phenolics in the aerial parts of *Trifolium* species.
J Agric Food Chem 55(20), 8095-100.

Oliveira, R. A.; Narciso, C. D., et al. (2010):
Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves.
Journal of Dairy Science 93(9), 4280-4291.

Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W., et al. (2002):
Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.
Nucleic Acids Research 30(9), 36.

Platel, K.; Srinivasan, K. (1996):
Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats.
International Journal of Food Sciences and Nutrition 47(1), 55-9.

Platel, K.; Srinivasan, K. (2000):
Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats.
Food / Nahrung 44(1), 42-46.

- Platel, K.; Srinivasan, K. (2001):
Studies on the influence of dietary spices on food transit time in experimental rats.
Nutrition Research 21(9), 1309-1314.
- Procházková, D.; Bousová, I., et al. (2011):
Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids.
Fitoterapia 82(4), 513-523.
- Ramakrishna Rao, R.; Platel, K., et al. (2003):
In vitro influence of spices and spice-active principles on digestive enzymes of rat pancreas and small intestine.
Nahrung 47(6), 408-12.
- Ramesh, H. P.; Yamaki, K., et al. (2002):
Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells.
Carbohydrate Polymers 50(1), 79-83.
- Rao, P. U.; Sesikeran, B., et al. (1996):
Short term nutritional and safety evaluation of fenugreek.
Nutrition Research 16(9), 1495-1505.
- Rao, P. U.; Sharma, R. D. (1987):
An evaluation of protein quality of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) and their supplementary effects.
Food Chemistry 24(1), 1-9.
- Rao, P. U.; Sharma, R. D. (1989):
Effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) supplementation on the protein quality of rice (*Oryza sativum*), wheat (*Triticum astivum*) and jowar (*Sorghum vulgare*).
Food Chemistry 31(2), 139-148.
- Rauha, J.-P.; Remes, S., et al. (2000):
Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds.
International Journal of Food Microbiology 56(1), 3-12.
- Ravikumar, P.; Anuradha, C. V. (1999):
Effect of fenugreek seeds on blood lipid peroxidation and antioxidants in diabetic rats.
Phytotherapy Research 13(3), 197-201.
- Re, R.; Pellegrini, N., et al. (1999):
Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.
Free Radical Biology and Medicine 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J., et al. (1996):
Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.
Free Radical Biology and Medicine 20(7), 933-956.

- Rogério, A. P.; Dora, C. L., et al. (2010):
Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice.
Pharmacological Research 61(4), 288-297.
- Rubilar, M.; Jara, C., et al. (2011):
Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae Turcz.*): sources of antioxidant compounds and alpha-glucosidase/alpha-amylase inhibitors.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(5), 1630-7.
- Saavedra, M. J.; Dias, C. S., et al. (2012):
Antibacterial effects of glucosinolate-derived hydrolysis products against *enterobacteriaceae* and *enterococci* isolated from pig ileum segments.
Foodborne Pathogens and Disease 9(4), 338-45.
- Sahin, K.; Akdemir, F., et al. (2010):
Effects of dietary resveratrol supplementation on egg production and antioxidant status.
Poultry Science 89(6), 1190-8.
- Sauvaire, Y.; Baissac, Y., et al. (1996):
Steroid saponins from fenugreek and some of their biological properties.
Advances in experimental medicine and biology 405, 37-46.
- Schaefer, S.; Baum, M., et al. (2006):
Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines.
Molecular Nutrition and Food Research 50(1), 24-33.
- Schlesier, K. (2002):
Untersuchungen zum Polyphenolspektrum und zur antioxidativen Aktivität von Tee und zu Wechselwirkungen von Teepolyphenolen mit Eisen.
Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Dissertation. S.178
- Sehm, J.; Lindermayer, H., et al. (2007):
The influence of polyphenol rich apple pomace or red-wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets.
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 91(7-8), 289-96.
- Selma, M. V.; Larrosa, M., et al. (2012):
Resveratrol and some glucosyl, glucosylacyl and glucuronide derivatives reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* scott a adhesion to colonic epithelial cell lines.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(30), 7367-7374.
- Shia, C.; Hou, Y., et al. (2010):
Differences in pharmacokinetics and ex vivo antioxidant activity following intravenous and oral administrations of emodin to rats.

Journal of Pharmaceutical Sciences 99(4), 2185-2195.

Srichamroen, A.; Thomson, A. B. R., et al. (2009):
In vitro intestinal glucose uptake is inhibited by galactomannan from Canadian fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum* L) in genetically lean and obese rats.
Nutrition Research 29(1), 49-54.

Suja Pandian, R.; Anuradha, C. V., et al. (2002):
Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) on experimental gastric ulcer in rats.
Journal of Ethnopharmacology 81(3), 393-397.

Thomas, J. E.; Basu, S. K., et al. (2006):
Identification of *Trigonella* accessions which lack antimicrobial activity and are suitable for forage development.
Canadian Journal of Plant Science 86(3), 727-732.

Turner, A.; Chen, S. N., et al. (2005):
Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* by cranberry juice: A new antiadherence assay.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(23), 8940-8947.

Uemura, T.; Hirai, S., et al. (2010):
Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues.
Molecular Nutrition & Food Research 54(11), 1596-608.

Ussing, H. H.; Zerahn, K. (1951):
Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.
Acta Physiologica Scandinavica 23(2-3), 110-127.

Vanleeuwen, P.; Jansman, A. J. M., et al. (1995):
Dietary effects of faba bean (*vicia faba l.*) tannins on the morphology and function of the small intestinal mucosa of weaned pigs.
British Journal of Nutrition 73(1), 31-39.

Verhelst, R.; Schroyen, M., et al. (2010):
The effects of plant polyphenols on enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesion and toxin binding.
Livestock Science 133(1/3), 101-103.

Vijaya, K.; Ananthan, S. (1996):
Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs.
Indian journal of pharmaceutical sciences 58, 191-193.

Vrhovsek, U.; Rigo, A., et al. (2004):
Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(21), 6532-6538.

Vyas, S.; Agrawal, R. P., et al. (2008):
Analgesic and anit-inflammatory activities of *Trigonella foenum-fraecum* (seed) extract.
Acta Poloniae Pharmaceutica 65(4), 473-476.

Wang, R. L.; Hou, Z. P., et al. (2010):
Effects of feeding galactomannan oligosaccharides on growth performance, serum antibody levels and intestinal microbiota in newly-weaned pigs.
Journal of Food Agriculture & Environment 8(3-4), 47-55.

Watzl, B.; Leitzmann, C. (1999):
Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln.
Stuttgart: Hippokrates Verlag GmbH.

Watzl, B.; Rechkemmer, G. (2001):
Flavonoide.
Ernährungsumschau 12, 498 - 502.

Wetscherek, W. (2005):
Einsatz von ätherischen Ölen (Fresta F) in der Ferkelaufzucht.
4. BOKU-Symposium Tierernährung, Wien.

Wiegand, H.; Boesch-Saadatmandi, C., et al. (2009):
Effects of quercetin and catechin on hepatic glutathione-S transferase (GST), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and antioxidant enzyme activity levels in rats.
Nutrition and Cancer 61(5), 717-22.

Wiegand, H.; Boesch-Saadatmandi, C., et al. (2010):
Dietary flavonoids do not affect vitamin E status in growing rats.
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 94(3), 307-18.

Wollgast, J.; Anklam, E. (2000):
Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?
Food Research International 33(6), 449-459.

Wu, H. Z.; Fei, H. J., et al. (2012):
Antibacterial mechanism of sulforaphane on *Escherichia coli*.
Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 43(3), 386-90.

Xue, W. L.; Lei, J., et al. (2011):
Trigonella foenum graecum seed extract protects kidney function and morphology in diabetic rats via its antioxidant activity.
Nutrition Research 31(7), 555-562.

Yan, L.; Kim, I. H. (2011):

Effect of dietary grape pomace fermented by *Saccharomyces boulardii* on the growth performance, nutrient digestibility and meat quality in finishing pigs.
Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 24(12), 1763-1770.

Zhu, L. H.; Zhao, K. L., et al. (2012):
Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs.
Journal of Animal Science 90(8), 2581-2589.

Zhu, M.; Fahl, W. E. (2001):
Functional Characterization of Transcription Regulators That Interact with the Electrophile Response Element.
Biochemical and Biophysical Research Communications 289(1), 212-219.

Publikationsverzeichnis

51. Jahrestagung der Bayerischen Arbeitsgemeinschaft Tierernährung e.V.

Freising – 07.10.-07.10.2013

Krämer, C.; Zentek, J.; Goerke, M.; Wendler, K. R.

Improvement of growth performance and apparent ileal digestibility of crude protein by a zoo-technical phytogetic feed additive.

Tierernährung und Tierwohl – C. Fahn, W. Windisch (Hrsg.)

München: Selbstverlag: Bayerische Arbeitsgemeinschaft Tierernährung e.V. S.168

ISBN: 978-3-9816116-0-1

67. Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie

Göttingen 19.–21. März 2013

C. Krämer, J. Zentek – Berlin

Influence of phytogetic feed additives in a porcine intestinal epithelial cell line (IPEC-J2)

Proc. Soc. Nutr. Physiol. 20:173

7. Doktorandensymposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Berlin 13.Juli 2013

C. Krämer – Berlin

Einfluss phytogener Futterzusatzstoffe auf die zelluläre Interaktion zwischen einer IPEC-J2-Zelllinie und einem enteropathogenen *Escherichia coli*

7. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences“

Danksagung

Danksagung

Mein herzlichster Dank geht an

... Herrn Professor Dr. Zentek für die Überlassung des Themas sowie der Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut für Tierernährung durchzuführen. Für die Anleitung, stetige Unterstützung und die ermöglichte Finanzierung möchte ich mich ebenfalls bedanken.

... die Firma Delacon für die Bereitstellung des Stipendiums sowie die gute Zusammenarbeit während der letzten zwei Jahre.

... das gesamte Team des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin. Ich danke den technischen Assistentinnen für ihre Unterstützung in allen Bereichen des Labors, den Tierpflegern für ihre Hilfe während des Tierversuchs, den wissenschaftlichen Mitarbeitern und anderen Doktoranden für ihre Unterstützung, tatkräftige Hilfe und hilfreichen Ratschläge zu jeder Zeit.

...all meine großartigen Freunde für die moralische Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeitszeit, sei es persönlich oder am Telefon.

... Volker für Deine Gelassenheit, tröstenden Worte und Rückhalt trotz Deiner eigenen Dissertation und ihren Problemen. Bitte lass uns nie wieder gleichzeitig promovieren!

Der letzte und größte Dank gebührt meiner Familie für die Unterstützung während meines gesamten Wegs bis hierhin. Ohne Euch hätte ich es nicht mal bis zur Hälfte geschafft. Danke für Eure aufbauenden Worte und offenen Ohren, Euer nicht kleiner werdende Glaube an mich!

DANKE!

Selbstständigkeitserklärung

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den

Carolin Krämer