

C Material und Methoden

1. Das Untersuchungsmaterial

1.1. Allgemeiner Versuchsaufbau

Anhand von makroskopischen, mikroskopischen und ultrastrukturellen Untersuchungen sollte der Aufbau der plantaren Schuppenhäute (reticulate scales) der Pute untersucht werden. Zusätzlich wurde das epidermale Fettsäuremuster dieser Hautregion biochemisch / molekularbiologisch bestimmt. Darüber hinaus wurde der Einfluss dreier unterschiedlicher Biotinsupplementierungen (Standard, doppelter Standard, vierfacher Standard) auf die Fußballenbeschaffenheit und das Fettsäuremuster untersucht. Die Untersuchungen wurden an demselben Tiermaterial durchgeführt. Durch Probenentnahme an unterschiedlichen Terminen (6., 14. und 21. Lebenswoche) konnten die verschiedenen Altersstufen verglichen und damit ein zeitlicher Verlauf berücksichtigt werden. Aufgrund der guten Mastleistungen der doppelt biotindosierten Tiere wurde zusätzlich zur ursprünglichen Planung ein zweiter Durchlauf mit Verfütterung der Standard- und doppelt biotinsupplementierten Ration gestartet. Nach Beendigung dieses Wiederholungsversuchs (21 Mastwochen) konnte auch von diesen Tieren die Fußballenbeschaffenheit makroskopisch beurteilt und exemplarisch ultrastrukturell untersucht werden. Zusätzlich wurden Hautproben dieser Tiere zur Analyse des Fettsäuremusters herangezogen.

1.2. Tiermaterial, Größe der Fütterungsgruppen und Haltungsbedingungen

Für die Untersuchungen wurden schwere Mastputenhähne der Herkunft B.U.T. Big 6 verwendet. Zur Sicherstellung identischer Mastbedingungen wurden die Tiere im Hauptversuch in drei Fütterungsgruppen aufgeteilt (Gesamttierzahl pro Gruppe = 312 Hähne) und pro Gruppe in vier gleichmäßig im Stall verteilte Buchten à 78 Tiere aufgestallt. Als Einstreu wurden Hobelspäne verwendet, die wöchentlich nachgestreut wurden. Zur Aufrechterhaltung des Stallklimas diente eine Schwerkraftlüftung mit Stegplatten-Jalousien. Die ad-libitum-Fütterung erfolgte über eine vollautomatische Computerfütterungsanlage. Als Frischwasserzug dienten in jeder Bucht zwei automatische Glockentränken.

1.3. Versuchsdiäten

Den Tieren wurde eine auf Weizen (mit dem Alter zunehmende Anteile) und Soja (mit dem Alter abnehmende Anteile) basierende, halbsynthetische, pelletierte Diät gefüttert. Durch das zum Zeitpunkt des Hauptversuchs herrschende Verbot von Zusatzstoffen tierischer Herkunft wurde erstmalig ein rein vegetarisches Futter eingesetzt. Beim Durchgang des Wiederholungsversuchs war der Einsatz von Fischmehl wieder genehmigt. Zur Feststellung eines Bio-

tineinflusses auf die Fußballenbeschaffenheit und das epidermale Fettsäuremuster wurde den Tieren der verschiedenen Fütterungsgruppen jeweils eine bestimmte Versuchsdiet gefüttert. Die Versuchsdieten (Tab. 2) wurden vom 1. Lebenstag bis zur Schlachtung in der 21. Mastwoche (Tieralter: 146 Tage) verfüttert. Das Standardmastfutter enthielt, wie kommerziell üblich, in den ersten 14 Mastwochen eine Biotinzulage von 220 µg Biotin / kg Mastfutter (P1 bis P4) und in den letzten 6 Mastwochen 150 µg Biotin / kg Mastfutter (P5 und P6). Diesem Standardmastfutter wurde für die anderen Fütterungsgruppen die doppelte bzw. vierfache Biotinzulage zugesetzt. Im Wiederholungsversuch entfiel die Versuchsgruppe „vierfach“, weil nur die Tiere der doppelt biotindosierten Gruppe im Hauptversuch bessere Mastleistungen zeigten.

Tabelle 2: Versuchsdieten

		Biotingehalt¹ im Endfutter je kg	
		P1 bis P4 (1. Tag bis 14. Mastwoche)	P5 und P6 (15. bis 21. Mastwoche)
Versuchsgruppen	Standard	220 µg	150 µg
	doppelt	440 µg	300 µg
	vierfach	880 µg	600 µg

¹Ohne Berücksichtigung der nativen Gehalte der einzelnen Rohkomponenten

1.4. Analyse der Futterbiotingehalte

Jeweils eine Futterprobe der unterschiedlichen Fütterungsprogramme (P1 bis P6) wurde mittels eines mikrobiologischen Nachweisverfahren mit *Lactobacillus plantarum* auf seinen Biotingehalt hin überprüft.

2. Makroskopische Beurteilung

Im Hauptversuch wurden nach 6, 14 und 21 Mastwochen sowohl der Allgemeinzustand als auch die Fußballenbeschaffenheit der Tiere anhand vorgegebener Bewertungskriterien bestimmt. Um ein zusätzliches, stressinduzierendes Handling zu vermeiden, wurde die makroskopische Beurteilung der ausgewählten Tiere während der routinemäßigen Wägung durchgeführt und fotografisch dokumentiert. Die makroskopische Beurteilung ist von zwei voneinander unabhängigen Tierärztinnen durchgeführt worden. In einem Vorversuch wurde getestet, ob die Kriterien anwendbar sind und von den beiden Beurteilenden in gleicher Weise interpretiert werden. Am ersten und zweiten Untersuchungstermin (6 und 14 Wochen) wurden für die Beurteilung des Allgemeinzustands und der Fußballenbeschaffenheit aus jeder Bucht 10 Tiere zufällig ausgewählt. Dadurch ergab sich pro Termin ein Stichprobenumfang von 40 Tieren pro Fütterungsgruppe bzw. 120 Tieren insgesamt. Beim dritten Untersuchungstermin (21 Wochen) konnte der Allgemeinzustand an 35 zufällig ausgewählten Tieren pro

Bucht beurteilt werden, wodurch sich für diese Untersuchung pro Fütterungsgruppe ein Stichprobenumfang von 140 Tieren ergab, also von 420 Tieren insgesamt. Die Beurteilung der Fußballenbeschaffenheit wurde zur weiteren Stressreduktion nach der Schlachtung durchgeführt. Dafür wurden bei der Wägung pro Fütterungsgruppe 49 Tiere zufällig ausgewählt und markiert. Nach der Schlachtung wurden die Fußpaare der ausgewählten Tiere vom Schlachtband entnommen. Pro Fütterungsgruppe wurden 49 Fußpaare beurteilt, wodurch sich für diese Untersuchung beim dritten Untersuchungstermin ein Stichprobenumfang von insgesamt 147 Tieren ergab. Von den Tieren des Wiederholungsversuchs wurde die Fußballenbeschaffenheit nach Beendigung der Mastperiode (Schlachtung: 21. Mastwoche / 140 Tage) beurteilt. Von insgesamt 510 zur Schlachtung gelangten Tieren wurde pro Versuchsgruppe eine zufällige Stichprobe von 20 Tieren makroskopisch beurteilt (Gesamtzahl: 40), die vor der Schlachtung entsprechend der Fütterungsgruppen markiert wurden. Aufgrund einer hohen Übereinstimmung der Beurteilenden im Hauptversuch wurde bei diesen Tieren auf eine Doppelbeurteilung verzichtet.

Parameter zur Bestimmung des Allgemeinzustands waren der Befiederungszustand und der Verschmutzungsgrad des Tieres mit jeweils 3 zur Verfügung stehenden Teilnoten (Tab. 3a) sowie der Zustand der Brusthaut mit insgesamt 6 zur Verfügung stehenden Teilnoten (Tab. 3b). Der Allgemeinzustand wurde über die Summe der Benotung für die Parameter Befiederungszustand, Verschmutzungsgrad des Tieres und Zustand der Brusthaut definiert, so dass eine Gesamtnote zwischen 3 und 12 entstand. Die Bewertung der Fußballen resultierte aus der Kombination der Art und des Schweregrades der vorhandenen Veränderungen, wobei den Beurteilenden 11 Teilnoten zur Verfügung standen (Tab. 4). Die Fußballen des linken und rechten Fußes wurden getrennt voneinander benotet. Beim ersten und zweiten Untersuchungstermin wurden die Körpergewichte der ausgewählten Tiere, beim dritten Untersuchungstermin die sämtlicher Tiere notiert.

Tabelle 3: Kriterien zur Beurteilung des Allgemeinzustands

Tabelle 3a: Kriterien zur Beurteilung des Befiederungszustands und des Verschmutzungsgrades

Note	Befiederungszustand	Verschmutzungsgrad
1	intakt	sauber
2	Zerzaust, bis markstückgroße, federlose Bereiche und/oder >1/2 Schwanzlänge erhalten	Bis handtellergröße Bereiche leicht verschmutzt
3	Stark ausgefranst, >markstückgroße, federlose Bereiche und / oder <1/2 Schwanzlänge erhalten	Über handtellergröße Bereiche verschmutzt und / oder Federn flächig verklebt

Tabelle 3b: Kriterien zur Beurteilung des Brusthautzustands

Note	Brusthautzustand
1	Unverändert
2	Vereinzelte, kleinflächige, frei verschiebliche Verschorfung
3	Multiple kleinflächige, frei verschiebliche Verschorfungen
4	Nicht frei verschiebliche, vereinzelte, knopfartige, kleinflächige Verschorfungen
5	Nicht frei verschiebliche, multiple, knopfartige Verschorfung
6	Vorhandensein einer Brustblase

Tabelle 4: Kriterien der makroskopischen Fußballenbeurteilung

Note	Kriterien
1	Keine makroskopisch erkennbaren Veränderungen
2	Hyperkeratose der reticulate scales
3	Hyperkeratose und rötlichbraune Einfärbung einzelner reticulate scales
4	Hyperkeratose und multiple Einfärbung der reticulate scales
5	Hyperkeratose, Einfärbung der reticulate scales und kleinflächige Verkrustungen einzelner reticulate scales
6	Hyperkeratose und Verkrustungen multipler reticulate scales
7	Hyperkeratose und bis 1/5 des Metatarsalballens einnehmende, flächige Verkrustung
8	Hyperkeratose und bis 1/3 des Metatarsalballens einnehmende, flächige Verkrustung
9	Hyperkeratose und bis die Hälfte des Metatarsalballens einnehmende Verkrustung
10	Hyperkeratose und mehr als die Hälfte des Metatarsalballens einnehmende Verkrustung
11	Gesamte Fußungsfläche einnehmende Verkrustung

3. Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit SPSS für Windows Version 10.0 durchgeführt. Es sollte ermittelt werden, ob ein Einfluss der Fütterungsgruppe oder des Lebensalters der Tiere auf den Allgemeinzustand und die Fußballenbeschaffenheit erkennbar waren. Zunächst wurden die Beurteilungen der beiden Untersucherinnen auf den Grad der Übereinstimmung hin überprüft, um deren Aussagefähigkeit zu sichern. In beiden Untersuchungen wurde eine Abweichung der Beurteilenden von bis zu zwei Teilnoten als vernachlässigbar angenommen. Auch zur Überprüfung der Übereinstimmung der Benotung

der Fußballen links zu rechts wurde eine maximale Abweichung von zwei Teilnoten als vernachlässigbar angenommen. Bei einer Übereinstimmung der beiden Beurteilenden von mindestens 90 % wurden die Daten für die weitere Auswertung zu einem Mittelwert zusammengefasst. (Durch ungleiche Beurteilungen der Fußpaare entstanden dabei Noten mit Dezimalwerten.)

Zur vergleichenden Darstellung der Beurteilungen wurden Boxplots hergestellt, in denen jeweils der Median, die 25 % und 75 % Quartile, die 1,5-fachen Interquartilsstrecken (Whiskers) sowie Ausreißer (Kreise) und Extremwerte (Sterne) dargestellt werden. An der y-Achse wurden die Mittelwerte der beiden Beurteilungen aufgetragen, die x-Achse wurde nach Fütterungsgruppen bzw. Altersstufen aufgeteilt.

Zur Bestimmung eines Einflusses der Fütterungsgruppen bzw. der Altersstufen auf die Ergebnisse der Beurteilungen wurde der KRUSKAL-WALLIS-TEST angewendet. Bei einem signifikanten Ergebnis ($p < 0,05$) wurden die einzelnen Fütterungsgruppen bzw. Alterstufen anschließend unter Anwendung des MANN-WHITNEY-U-TESTs miteinander verglichen. Da in diesen Fällen jeweils 3 Tests durchgeführt wurden, die nicht unabhängig voneinander zu werten sind, wurde das Signifikanzniveau von 0,05 auf 0,017 korrigiert. Die Beurteilung der Fußballenbeschaffenheit der Tiere des Wiederholungsversuchs wurde unter Anwendung des KRUSKAL-WALLIS-TEST bezüglich der unterschiedlichen Fütterungsgruppen analysiert und mit den Ergebnissen der gleichaltrigen Tiere des Hauptversuchs verglichen.

Mittels einer univariaten Varianzanalyse (UNIANOVA - $p = 0,05$), ggf. mit nachfolgendem paarweisen Mehrfachvergleich der Mittelwerte (LSD¹ Test – $p = 0,017$), wurde ein möglicher Einfluss der Fütterungsgruppen auf das Körpergewicht untersucht.

4. Die Probenentnahme für die mikroskopischen und ultrastrukturellen Untersuchungen

Die Untersuchungen wurden an den reticulate scales der Metatarsal- und Digitalballen durchgeführt. Im Hauptversuch wurden zur Entnahme der Hautproben pro untersuchter Altersstufe (6, 14, 21 Wochen) jeweils 16 Tiere pro Fütterungsgruppe (je vier Tiere pro Bucht) zufällig ausgewählt. Die ausgewählten Tiere im Alter von 6 Wochen wurden zur Probenentnahme getötet. Sofort nach der Tötung wurde der Metatarsalballen einer Gliedmaße bis zur Subcutis mit einem Skalpell entfernt. Exakt zwei Drittel dieser Gewebeprobe wurden für die Anwendung von lichtmikroskopischen Techniken, das restliche Drittel für transmissionselektronenmikroskopische Techniken fixiert (s. u.). Die Beinpaare wurden pro Bucht markiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die nach 14 Wochen während der ma-

¹ LSD : lowest significant difference - äquivalent zu multiplen individuellen T-Tests zwischen allen Gruppenpaaren

makroskopischen Beurteilung ausgewählten Tiere wurden pro Bucht und jeweils an beiden Gliedmaßen markiert. Bei der anschließenden kommerziellen Schlachtung wurde ihnen vor dem Brühvorgang der Metatarsalballen einer Gliedmaße großzügig entfernt. Diese Proben wurden für die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden aufgeteilt und entsprechend den verschiedenen Techniken fixiert. Die Beinpaare wurden am Ende der Schlachtkette eingesammelt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Die Zugehörigkeit der Fußballenprobe zu den Gliedmaßenpaaren wurde einerseits durch die Notierung der Schlachtreihenfolge und andererseits durch das Anpassen der Proben an die Schnittstelle erzielt. Nach 21 Mastwochen wurden die ausgewählten Tiere im Vorfeld der Schlachtung pro Gruppe markiert. Die Hautproben wurden nach dem Einsammeln der Beinpaare am Ende der Schlachtkette entnommen. Bei dem Durchlaufen des Brühvorgangs blieben die Fußpaare oberhalb der Wasseroberfläche. Beim Wiederholungsversuch wurden vor der Schlachtung jeweils 20 zufällig ausgewählte Tiere entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit gekennzeichnet und die Beinpaare am Ende der Schlachtkette eingesammelt. Exemplarisch wurde von drei zufällig ausgewählten Tieren jeder Fütterungsgruppe unmittelbar nach der Schlachtung eine Probe der makroskopisch unveränderten Digitalballen zur ultrastrukturellen Untersuchung entnommen und fixiert. Nach der Probenentnahme wurden die Beinpaare bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

5. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an mit Formol fixierten Paraffinschnitten durchgeführt. Für die Sudanschwarz-B-Färbung wurden unfixierte Kryostatschnitte verwendet. Zur Untersuchung kamen ausschließlich Proben der Tiere des Hauptversuches.

5.1. Das Herstellen von Paraffinschnitten

5.1.1. Die Paraffineinbettung

Die für die Paraffineinbettung bestimmten Hautproben wurden unmittelbar nach deren Entnahme in eine 4 %ige Formol-Kalzium-Fixationslösung nach BAKER (ROMEIS, 1989) verbracht und für mindestens 24 Stunden immersionsfixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben mit einem Skalpell auf eine Kantenlänge von ca. 1 x 1 cm zugeschnitten und für eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gespült. Mit Hilfe einer Histokinette wurden die fixierten und gespülten Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol sowie anschließend in Paraplast verbracht und zur Einbettung mit Paraplast zu Blöckchen ausgegossen.

5.1.2. Das Schneiden der Paraffinblöckchen

An einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) wurden mit einem C-Messer von den Paraffinblöckchen Schnitte mit einer Dicke von 5 µm hergestellt und in einem ca. 50 – 52°C warmen Wasserbad gestreckt. Zur Vermeidung eines Abschwimmens der Schnitte bei der weiteren Bearbeitung wurden diese auf mit 3-Aminopropyltriethoxy-Silane beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht in einem Brutschrank bei 54°C ange-trocknet. Jeder Objektträger wurde mit drei bis vier Schnitten bestückt. Die Objektträger wur-den bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur staubfrei gelagert.

5.2. Die histologische Übersichtsfärbung

Zur histologischen Übersichtsfärbung wurde die H.E.-Färbung (Hämalaun nach MAY-ER / Eosin) aus ROMEIS (1989) angewendet. Von den Tieren im Alter von 6 und 14 Wochen kamen die Proben von jedem ersten und dritten pro Bucht ausgewählten Tier zur Unter-suchung. Da bei den Tieren im Alter von 21 Wochen die Herkunft der Bucht nicht mehr nach-vollzogen werden konnte, wurden von dieser Altersstufe die Proben von jedem zweiten Tier pro Gruppe untersucht. Daraus ergab sich zur Auswertung der H.E.-Übersichtsfärbung ein Gesamtumfang von 72 Objektträgern mit jeweils drei bis vier Schnitten.

5.3. Die histochemischen Nachweise

5.3.1. Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

In dieser Untersuchung wurde die Periodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion nach McMANUS (ROMEIS, 1989) angewendet. Sie dient dem semiquantitativen Nachweis von Glykogen, Gly-koproteinen und Glykolipiden in der Epidermis. PAS-positive Strukturen werden purpurrot, schwach positive hellrosa und PAS-negative farblos dargestellt. Durch Präinkubation mit Diastase (2 g mit > 1300 U / g in 100 ml H₂O für eine Stunde bei 37°C) mit anschließender Spülung und Anwendung der PAS-Reaktion können die diastases stabilen PAS-positiven Gly-koproteine und Glykolipide vom diastaselabilen und daher PAS-negativ reagierenden Glyko-gen abgegrenzt werden. Die Färbungen wurden bei den 6 und 14 Wochen alten Tieren an den Paraffinproben jedes ersten und dritten Tieres einer Bucht und jeder zweiten Probe der 21 Wochen alten Tiere durchgeführt. Daraus ergab sich zur Auswertung der PAS-Reaktion (ohne Diastase-Präinkubation) ein Gesamtumfang von 72 Objektträgern. Als Positivkontrolle für den ordnungsgemäßen Ablauf der Reaktion wurden Schnitte von in Paraffin eingebetteter Hundeleber mitgeführt.

5.3.2. Semiquantitativer Nachweis von Sulfhydrylgruppen und Disulfidbrücken (SH- und SS-Gruppennachweis)

Durch den semiquantitativen Nachweis von Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) und Disulfidbrücken (SS-Gruppen) in der Epidermis nach BARNETT und SELIGMANN (1952, 1954) kann die Festigkeit der Keratinfilamentbündelung aufgrund von Disulfidbrückenbildung beurteilt werden. Zur Vermeidung des Abschwimmens der Proben mussten die Objektträger celloidinisiert werden: Die Paraffinschnitte wurden nach der Entparaffinierung für 2 bis 3 Minuten in absoluten Alkohol überführt und dann für 3 bis 5 Minuten in 0,5 %ige Celloidinlösung verbracht. Nach Abtropfen und kurzer Trocknung der Objektträger erfolgte die Aushärtung des Celloidins für einige Minuten in 70 %igem Ethanol.

Bei dieser Nachweismethode müssen vier verschiedene Farbreaktionen durchgeführt werden, die im Folgenden nach der Beschreibung von BARNETT und SELIGMANN (1952, 1954) für in Paraffin eingebettetes Material dargestellt werden. Es wurden Proben von jedem ersten pro Bucht ausgewählten Tier im Alter von 6 und 14 Wochen untersucht. Daraus ergab sich ein Gesamtumfang von 96 Objektträgern. Aufgrund einer zu geringen Differenz im Biotingehalt einzelner Versuchsdiäten der letzten zwei Futterchargen wurde bei den 21 Wochen alten Tieren auf den SH- und SS-Gruppennachweis verzichtet.

Als Kontrollproben für den korrekten Reaktionsablauf wurden Schnitte von paraffineingebetteter Schweinehaut mitgeführt.

Der Sulfhydrylgruppennachweis (SH-Gruppennachweis)

Zum Nachweis der Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) wurde die Dihydroxy-Dinaphtyl-Disulfid-Reaktion (DDD-Reaktion) nach BARNETT und SELIGMANN (1952) eingesetzt. Ein niedriger SH-Gruppengehalt ergibt durch einseitige Kopplung des Fast-Blue-B-Salzes eine rote Färbung, ein hoher Gehalt durch bilaterale Kopplung eine Blaufärbung.

Der Disulfidgruppennachweis (SS-Gruppennachweis)

Der SS-Gruppennachweis erfolgte mit der DDD-Reaktion nach vorheriger Blockierung der SH-Gruppen und anschließender Reduktion der SS- zu SH-Gruppen (BARNETT und SELIGMANN, 1954).

Zunächst wurden die vorhandenen SH-Gruppen mit N-Ethylmaleinimid bei 37°C für 12 Stunden blockiert. Anschließend wurde erst in einer 1 %igen Essigsäurelösung und danach in Aqua destillata (Aqua dest.) gespült. Die Reduktion der SS-Gruppen mit Natriumthioglykolat zu SH-Gruppen wurde bei 56°C für 2 Stunden durchgeführt. In dieser Weise neu entstandene SH-Gruppen repräsentieren die ursprünglich vorhandenen Disulfidbrücken, die durch eine sich anschließende DDD-Reaktion nachgewiesen wurden. Eine Rotfärbung entspricht einem niedrigen Gehalt, eine Blaufärbung einem hohen Gehalt an SS-Gruppen.

Der kombinierte SH- /SS-Gruppennachweis

Nach Reduktion der SS-Gruppen (s. o.) wird die DDD-Reaktion zum Nachweis der SH-Gruppen durchgeführt (Red DDD).

Die Kontrolle der SH-Gruppen-Blockierung

Nach 12- bis 24-stündiger Blockierung der SH-Gruppen in N-Ethylmaleinimid wurden die Proben - wie oben beschrieben - ausgewaschen und die DDD-Reaktion angeschlossen (Block DDD). Positive Reaktionen sind auf reduzierende Nicht-SH-Gruppen zurückzuführen und von den SH-Gruppennachweisen „abzuziehen“.

Die Auswertung der Farbniederschläge aller Proben wurde an demselben Tag durchgeführt und ihre Zuordnung erfolgte nach KORTE (1987) auf einer Skala von 0 bis 7 (Tab. 5).

Tabelle 5: Bezeichnung der Reaktionsstärke beim SH- / SS-Gruppennachweis in Abhängigkeit vom Farbton (in Anlehnung an KORTE, 1987)

Reaktionsintensität	Färbung	Gehalt an SH- / SS-Gruppen
0 = keine Reaktion	farblos	niedriger Gehalt an SH- / SS-Gruppen
1 = schwach positiv	rosa	
2 = schwach bis mittelgradig positiv	rosarot	
3 = mittelgradig positiv	dunkelrot	
4 = mittelgradig bis stark positiv	rotviolett	
5 = stark positiv	violett	
6 = stark bis sehr stark positiv	blauviolett	
7 = sehr stark positiv	blau	hoher Gehalt an SH- / SS-Gruppen

5.3.3. Der Fettnachweis mit Sudanswarz B

Die Sudanswarz-B-Färbung (nach ROMEIS, 1989) dient der allgemeinen Lipiddarstellung innerhalb der Zellen und im Interzellularraum der Epidermis. Zur Färbung wurden unfixierte Proben verwendet, die von den tiefgefrorenen Beinpaaren entnommen wurden, auf eine Kantenlänge von maximal 1 x 1 cm zugeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Diese zugeschnittenen, schockgefrorenen Proben wurden mit Hilfe der Objektträgerschnellkühlung in Tissue-Tek® (MILES Inc., USA) auf den Präparatehalter des Kryostaten vom Typ 500 (MICROM, Heidelberg) angefroren. Bei einer Schneidetemperatur von -25°C konnten dann mit einem C-Messer an einem Gefriermikrotom 6 – 9 µm dicke Schnitte hergestellt werden. Diese wurden auf mit 3-Aminopropyltriethoxy-Silane beschichtete Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur über Nacht angetrocknet und schließlich bis zur Färbung bei Raumtemperatur staubfrei gelagert. Die Färbezeiten für Sudanswarz B betragen je nach Schnittdicke 3 bis 4 Minuten. Eine schwarzgraue Färbung entspricht einem hohen, eine hellgraue Färbung einem niedrigen Gehalt an Lipiden. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Färbezeit zwei Minuten).

Der Fettnachweis wurde an den Proben jedes ersten Tieres im Alter von 6 und 14 Wochen durchgeführt, sodass insgesamt 24 Proben ausgewertet wurden. Auf die Untersuchung der 21 Wochen alten Tiere wurde aufgrund der zu geringen Differenzen des Futter-Biotingehaltes verzichtet.

6. Die rasterelektronenmikroskopischen Techniken (SEM)

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurde an drei verschiedenen Oberflächen durchgeführt: der äußeren und inneren epidermalen Oberfläche sowie der dermalen Oberfläche des Papillarkörpers. Aus den unfixierten, tiefgefrorenen Beinpaaren wurden Fußballenproben des Metatarsal- oder Digitalballen entnommen. Diese wurden zur Trennung von Epidermis und Dermis für 12 Stunden bei 37°C in einer 1 %igen Essigsäurelösung eingeweicht. Nach der Trennung wurden die Teilstücke mit KARNOVSKY'S Fixans (7,5 % Glutaraldehyd, 3 % Paraformaldehyd) fixiert, mit 1 %igem Osmiumtetroxid (OsO_4) nachfixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zur Trocknung wurden die Proben in Hexamethyldisilazan (HMDS) eingelegt und über Nacht im Vakuumschrank aufbewahrt. Daraufhin wurden sie mit Leit-Carbon auf Aluminiumteller aufgeklebt und in einem Kathodenzerstäubungsgerät mit Gold in einer Schichtdicke von 50 nm besputtert. Die Auswertung erfolgte an einem Rasterelektronenmikroskop NANOLAB 2000 der Firma BAUSCH & LOMB / ARL (Kanada / Ottawa). Die SEM-Untersuchung wurde an den Proben der Tiere des Hauptversuchs durchgeführt. Jedes erste der pro Bucht ausgewählten Tiere wurde untersucht, wodurch sich ein Gesamtumfang von 36 Proben ergab.

7. Die transmissionselektronenmikroskopischen Techniken (TEM)

Die Fußballenproben wurden für die Untersuchung am TEM direkt nach der Entnahme in ca. 0,5 x 0,5 cm große Stücke zugeschnitten und in KARNOVSKY'S Fixans (nach ROMEIS, 1989) ca. 12 Stunden immersionsfixiert. Danach wurden die Proben mit 1 %igem OsO_4 nachfixiert und mehrfach mit 0,1-molarem Cacodylatpuffer gespült, bevor sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Propylenoxid gespült und in Agar 100 Resin (Fa. Agar Scientific Ltd.) eingebettet wurden.

7.1. Die Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Zur Ermittlung geeigneter Bereiche für die Ultradünnschnitttherstellung wurden an einem Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) mit Glasmessern Semidünnschnitte von 0,5 μm Dicke angefertigt und für die lichtmikroskopische Untersuchung eine Richardson Färbung (Methylenblau / Azur II) durchgeführt (RICHARDSON, 1960). Zur Auswertung kamen aus dem Hauptversuch von den 6 und 14 Wochen alten Tieren die Proben von jedem ersten und drit-

ten ausgewählten Tier pro Bucht sowie die pro Fütterungsgruppe entnommenen drei Proben der Tiere des Wiederholungsversuchs.

Von den ausgewählten Bereichen wurden dann mit einem Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) Ultradünnschnitte in einer Dicke von 50 bis 60 nm hergestellt, auf Kupfernetze aufgezogen und nach VENABLE und COGGESHALL (1965) schnittkontrastiert. Die Untersuchung wurde an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 10 CR der ZEISS AG, Oberkochen durchgeführt.

8. Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung der freien, epidermalen Gesamtfette

Dieser Teil der Untersuchungen wurde im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes am Department of Agriculture and Forestry der University of Aberdeen, Schottland durchgeführt. Anhand dieser Analyse wurde die Fettsäurezusammensetzung des freien Anteils der epidermalen Gesamtfette der reticulate scales bestimmt. Zusätzlich sollte ein Einfluss der angewandten unterschiedlichen Biotinsupplementierungen auf die Fettsäuresynthese ermittelt werden.

Das Analyseverfahren beruht auf einer für bovine Hornproben entwickelten Methode, die vom Department of Agriculture and Forestry, University of Aberdeen, Scotland in Anlehnung an WERTZ u. DOWNING (1983a und b) erarbeitet wurde. In einem Vorversuch wurde die Anwendbarkeit der Methodik auf die Fettsäureanalyse der reticulate scales der Pute bestätigt. Zur Minimierung des Probenumfangs sollten jeweils die Proben der gleichaltrigen Tiere aus derselben Bucht zusammengelegt (gepoolt) werden. In einem weiteren Vorversuch wurde daher anhand der Untersuchung und durch den Vergleich der Ergebnisse von Einzeltierproben derselben Bucht eine mögliche Veränderung der Gesamtergebnisse durch das Poolen ausgeschlossen. Zur Durchführung der Analyse wurden dementsprechend von den 6 und 14 Wochen alten Tieren des Hauptversuchs jeweils die vier Einzelproben jeder Bucht zu einer Probe zusammengelegt (insgesamt 24 Proben). Zur Bearbeitung der Proben aus dem Wiederholungsversuch wurden pro Fütterungsgruppe jeweils vier Proben bestehend aus jeweils vier Einzeltieren hergestellt (insgesamt 12 Proben). Insgesamt gingen 32 Proben in die Fettsäureanalyse ein. Aufgrund der Ergebnisse der Futteranalyse mit zu geringen Differenzen im Biotingehalt wurde auf die Untersuchung der Tiere aus der 21. Mastwoche des Hauptversuchs verzichtet.

8.1. Die Herstellung der Proben zur Fettsäureanalyse

Die eingefroren gelagerten Beinpaare wurden zur Abtrennung der Epidermis aufgetaut. Die Beinpaare wurden für maximal 30 Sekunden in ein auf 80 – 100°C erwärmtes Wasserbad

getaucht, wodurch die Epidermis von der Dermis abgelöst und über Nacht luftgetrocknet werden konnte. Analysiert wurden die reticulate scales der Epidermis des Metatarsal- und der Digitalballens.

Vor der Extraktion der Lipide wurden die Epidermisproben mit Hilfe einer Stickstoffmühle (Freezer Mill 6750, SPEX, CertiPrep, Inc., Metuchen, N.J., USA) pulverisiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

8.2. Die Lipidextraktion

Zum Poolen der Proben wurde von den 4 Einzeltierproben aus derselben Bucht je 1 g der pulverisierten Epidermis verwendet. Dadurch ergab sich eine Gesamtmenge von 4 g Pulver pro gepoolter Probe. Diese Probe wurde in einen 150 ml-QUICKFIT-Rundkolben verbracht, mit 50 ml einer Chloroform / Methanol-Lösung (2 : 1) vermischt und an ein Kondensatorsystem angeschlossen. In einem zweistündigen Refluxverfahren über einem erwärmten Wasserbad wurden die freien Lipidanteile aus der Probe extrahiert. Nach Herausfiltern und Verwerfen des Pulverrückstands wurde das in einen sauberen, vorgewogenen Rundkolben verbrachte flüssige Lipidextrakt (total lipid - TL) mit Hilfe eines rotierenden Evaporators (Rotavapor – R, Fa. Büchi, Flawil, Schweiz) verdampft und über Nacht in einem Vakuumschrank getrocknet. Dieses getrocknete Lipidextrakt wurde daraufhin gewogen, in einer Konzentration von 100 mg / ml erneut in einem Chloroform / Methanol-Gemisch (2 : 1) gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

Zur rotierenden Evaporation des Lösungsmittels wurde der Probe stets eine kleine Menge anti-bumping Granula zugesetzt.

8.3. Die Herstellung der Fettsäure-Methylester (FAME - fatty acid methyl ester)

Durch Transmethylierung des Lipidextraktes kommt es zur Ablösung der Fettsäurereste von den in der Probe enthaltenen komplexen Lipiden. Dafür wurde 1 ml (entspricht 100 mg Lipidgehalt) des kühl gelagerten Lipidextraktes in einem 30 ml-QUICKFIT-Reagenzglas verdampft. Dieser getrocknete Lipidanteil wurde zur Transmethylierung mit 25 ml einer Lösung aus Methanol und konzentrierter Salzsäure (5 : 1) versetzt und unter gelegentlichem Schütteln für 24 Stunden in einem auf 50°C erwärmten Wasserbad aufbewahrt. Danach wurde mit Hilfe eines Trennkolbens die transmethylierte Probe dreimal mit je 25 ml Hexan aus dem Gemisch herausgelöst. Die Hexanextrakte jeder Probe (obere Schicht) wurden kombiniert und zur Neutralisation der Säure mit 30 ml einer 2 %igen Kaliumbikarbonatlösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Verbringen der Probe in einen sauberen 100 ml-QUICKFIT-Rundkolben wurde das Lösungsmittel durch rotierende Evaporation verdampft. Dann wurde die Probe in 2 ml Hexan resuspendiert und in ein 10 ml-QUICKFIT-

Reagenzglas transferiert, das Lösungsmittel erneut verdampft und schließlich gelöst in ca. 400 µl Hexan bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

8.4. Separation der FAME durch Dünnschichtchromatographie

Die nun in der Probe enthaltenen Fettsäure-Methylester werden in Hydroxy (OH)- und Nicht-Hydroxy (nonOH)-Fettsäuren aufgetrennt, da für deren gaschromatographische Analyse zwei verschiedene Methoden verwendet werden müssen.

Vorbereitend wurden Glasplatten (25 x 25 cm) mit 0,5 mm Kieselgel Typ G beschichtet (75 g Kieselgel in 175 ml Aqua dest. pro fünf Platten) und durch Aufbewahrung bei 120°C für 2 Stunden vor Gebrauch aktiviert. Für die Dünnschichtchromatographie wurden die Platten mit jeweils 10 µl eines OH- und nonOH-Fettsäurestandards (Fa. Sigma®) sowie der gesamten Probe (20 Punkte á 20 µl = 400 µl) beladen. Dabei wurde zu dem unteren und den äußeren Rändern der Platte ein Freiraum von 2 cm belassen. Die Chromatographie wurde mit einem Lösungsmittelsystem von 85 ml Hexan und 15 ml Diethylether in einem abgeschlossenen Tank durchgeführt. Sobald die Solventfront 2 cm unterhalb des oberen Randes der Glasplatte angelangt war, wurde diese aus dem Tank entfernt, kurz unter dem Abzug luftgetrocknet und zur Darstellung der Banden mit 2,7-Dichlorofluorescein in 98 %igem Methanol besprüht. Mit einem UV-Sichtsystem CHROMATO-VUE® C-70 G (Fa. UVP, Inc.) mit einer Mischung aus kurz- (254 nm) und langwelligem (365 nm) Licht wurden die den Standards entsprechenden fluoreszierenden Banden markiert und getrennt voneinander von der Platte gekratzt. Das Kieselgel, welches die unteren, den OH-Fettsäuren entsprechenden Banden enthält, wurde in einem Probengefäß aufgefangen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

8.5. Die Aufbereitung der Nicht-Hydroxy (nonOH)-Fettsäuren

Das die nonOH-Fettsäuren enthaltene Gel (obere Bande) wurde in einem Reagenzglas aufgefangen und dreimal mit jeweils 10 ml Hexan gespült. Dabei wurde nach Schütteln und Absetzen des Gels der Überstand abpipettiert und in einem 100 ml-QUICKFIT-Rundkolben gesammelt. Das Lösungsmittel wurde durch rotierende Evaporation verdampft und die Probe danach zur gaschromatographischen Analyse in 1 ml Hexan in eine kleine Glasflasche gebracht.

8.6. Die Aufbereitung der Hydroxy (OH)-Fettsäuren

8.6.1. Acetylierung der OH-Fettsäuren

Bevor die OH-Fettsäuren gaschromatographisch analysiert werden können, müssen sie zur Beseitigung der α - und ω -Hydroxygruppe acetyliert werden. Dafür wurde das die OH-Fettsäuren enthaltende Kieselgel in eine oder mehrere mit Filterplättchen bestückte lösungsmittelresistente Plastiksäulen verbracht und die Fettsäuren mit jeweils 10 ml eines Gemisches aus Chloroform, Methanol und Aqua dest. (50 : 50 : 1) unter Druck aus dem Gel gelöst. Diese Lösung wurde in einem 15 ml-QUICKFIT-Reagenzglas aufgefangen und das Lösungsmittel mit einem rotierenden Evaporator verdampft. Nach der Trocknung wurde der Probe jeweils 5 ml saures Anhydrid und Pyridin vorsichtig hinzugefügt, das Gemisch kräftig geschüttelt und unter dem Abzug für 34 Stunden (mindestens 24 Stunden) bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach abgeschlossener Acetylierung wurde die Probe zweimal mit jeweils 5 ml Hexan versetzt. Um die Auftrennung der Probe in eine obere wässrige und untere Lösungsmittelphase zu erleichtern, wurde 1 ml Aqua dest. hinzugefügt und die Probe auf Eis gut geschüttelt, wodurch eine Überhitzung vermieden wurde. Die Hexanphasen wurden abpipettiert und in einem 15 ml-QUICKFIT-Reagenzglas gesammelt. Das Lösungsmittel wurde daraufhin rotierend verdampft.

8.6.2. Reinigung der acetylierten OH-Fettsäuren

Durch Dünnschichtchromatographie mit einem Lösungsmittelsystem aus Hexan, Diethylether und Eisessig (70 : 30 : 1) wurden die acetylierten α - und ω -OH-Fettsäuren für die nachfolgende Gaschromatographie gereinigt. Als Standard (Fa. Sigma[®]) lief je eine Mischung aus ω -OH (C16, 17, 22) und α -OH (C16, 18, 20, 22) acetylierten Fettsäuren sowie acetyliertem Cholesterin mit. Zur Darstellung der Banden wurden die Platten wie oben mit Fluoreszin besprüht. Die den Standards entsprechenden Banden wurden abgekratzt und gemeinsam wie zuvor beschrieben (Kapitel 8.6.1.) unter Druck aus dem Kieselgel gelöst. Dieses gesammelte Chloroform-Methanolextrakt wurde mit 2 ml einer 2-molaren Kaliumchloridlösung gewaschen. Nach Separation der Phasen wurde die obere wässrige Phase entfernt und verworfen. Um Reste des Fluoreszins aus der Probe zu entfernen, wurde diese mit ca. 1 ml einer 2,5 %igen wässrigen Kaliumcarbonatlösung versetzt. Die dabei entstehende untere Lösungsmittelphase wurde mit einer Pipette entfernt und in ein sauberes 10 ml-QUICKFIT-Reagenzglas verbracht, das Lösungsmittel wurde verdampft. Der Überstand wurde verworfen. Die nun getrocknete α - und ω -acetylierten FAME wurde in 0,5 ml Hexan resuspendiert und zur gaschromatographischen Analyse in eine kleine Glasflasche transferiert.

8.7. Gaschromatographische Analyse

Die gaschromatographische Untersuchung der hergestellten Proben wurde an einem Gaschromatographen 3800 der Firma VARIAN, Inc. durchgeführt. Es wurden jeweils 10 µl einer Probe analysiert. Für die Analyse der nonOH-Fettsäuren wurde eine DB-225-Säule (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm film coating) der Firma J + W Scientific® verwendet. Als Standards dienten FAME 2 (oil reference standard, Sigma®) mit C16:0, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6, C18:3n-3; FAME 3 (Sigma® Lipid Standard) mit C20:1n-9, C20:2n-6, C20:3n-3, C20:4n-6, C20:5n-3; FAME 6 (long chain FAME standard, Sigma®) mit C20:0, C22:0, C24:0, C26:0, C28:0, C30:0 und CLO (cod liver oil FAME (Sigma®)). Die Laufzeit betrug 90 Minuten, um auch längere Fettsäureketten in die Analyse mit einzubeziehen. Dabei wurde folgendes Temperaturschema angewendet: 2 Minuten bei 50°C mit nachfolgender Erhöhung der Temperatur um 20°C pro Minute auf eine Endtemperatur von 220°C, die bis zum Ende der Laufzeit gehalten wurde. Für die Analyse der OH-Fettsäuren wurde eine BP1-Säule (25 m x 0,22 mm; 0,25 µm film coating) der Firma SGE® verwendet. Als Standards dienten FAME 6 (Sigma®); α-Aco Mix mit acetylierter α-(OH)-C12:0, α-(OH)-C16:0, α-(OH)-C18:0, α-(OH)-C20:0, α-(OH)-C22:0; ω-Aco Mix mit acetylierter ω-(OH)-C16:0, ω-(OH)-C17:0, ω-(OH)-C22:0. Die Laufzeit betrug 40 Minuten mit folgendem Temperaturprogramm: 2 Minuten bei 100°C mit nachfolgender Temperaturerhöhung um 10°C pro Minute auf 300°C und einer weiteren Erhöhung um 1°C pro Minute auf eine Endtemperatur von 305°C. Die Daten wurden zur weiteren Bearbeitung computergestützt auf eine angeschlossene spezielle Software (Star Chromatography Work Station Version 5.51, VARIAN Inc.) überführt. Diese errechnet den prozentualen Anteil der Fettsäuren über die Fläche der entstehenden Peaks. Die nachgewiesenen Fettsäuren, die nicht anhand der mitgeführten Standards eindeutig identifiziert werden konnten, wurden der Reihe nach nummeriert.

9. Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus der Fettsäureanalyse

Zunächst wurde der durchschnittliche prozentuale Anteil der nicht kovalent gebundenen Gesamtfette, die aus den pulverisierten und gepoolten Hautproben gelöst wurden, in der Haut errechnet. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die Daten in SPSS für Windows Version 10.0 überführt. Die gaschromatographische Analyse bringt zum Teil Peaks hervor, die durch das normale Basisrauschen entstehen. Zur Eliminierung dieser Werte und zur Reduzierung der auszuwertenden Fettsäuren wurde ein Mindestanteil von 0,1 % festgelegt, der im Mittel aller Proben erreicht werden musste. Ausgenommen davon war C20:2n-6, eine nonOH-Fettsäure, die aufgrund ihres ω6-Status auch mit einem Gesamtmittel <0,1 % berücksichtigt wurde. Ziel der Auswertung war es, einen Einfluss der Fütterungsgruppen bzw. Altersstufen auf den Anteil der einzelnen Fettsäuren im Gesamtfettsäureanteil der Ex-

trakte zu ermitteln. Um einen vergleichenden Überblick über die Verteilung der Fettsäuren pro Fütterungsgruppe bzw. nach Lebensalter darzustellen, wurden Streudiagramme angefertigt. Die Daten wurden anhand der univariaten Varianzanalyse (UNIANOVA) unter Berücksichtigung der beiden unabhängigen Variablen (Alter und Fütterungsgruppe) ausgewertet. Bei Bestehen eines signifikanten Unterschieds ($p < 0,05$) wurden nachfolgend ein quantitativer Vergleich der mittleren Fettsäureanteile sowie ein paarweiser Mehrfachvergleich der Mittelwerte durchgeführt. Aufgrund einer bestehenden Inhomogenität der Varianzen wurde für den Mehrfachvergleich der Test nach Tamhane T2 ausgewählt. Das Signifikanzniveau wurde hierfür von 0,05 auf 0,017 korrigiert, da jeweils 3 Tests durchgeführt wurden, die nicht unabhängig voneinander zu werten sind.

Auf die statistische Auswertung der Lipidklassifizierung mit nachfolgender Fettsäureanalyse wurde aufgrund des exemplarischen Charakters dieser Untersuchung und des prozessierungsbedingten Verlustes auswertbarer Ergebnisse verzichtet.

10. Klassifizierung der freien, epidermalen Lipide der reticulate scales und Analyse ihrer Nicht-Hydroxy-Fettsäuren

Zur Klassifizierung der in der Epidermis der reticulate scales vorhandenen, ungebundenen Fette wurden die für die Fettsäureanalyse gewonnenen und kühl gelagerten Lipidextrakte (total lipid) verwendet. Diese Untersuchung wurde exemplarisch an den Proben der Tiere des Wiederholungsversuchs durchgeführt. Für die Dünnschichtchromatographie wurden die Glasplatten wie oben beschrieben vorbereitet (Kapitel 8.4.) und mit jeweils gleichen Volumina eines gemischten Standards, hergestellt aus Phospholipiden, Ceramiden (OH- und Nicht-OH-), Cholesterin, Cholesterinester und Triacylglycerin, sowie der Probe beladen. Für die Herstellung des gemischten Standards wurden jeweils 200 μl der verschiedenen Ausgangslösungen (10 mg / ml) vermengt, unter Stickstoff verdampft und erneut in 200 μl Chloroform gelöst. Zur Bereitstellung von genügend Probenmaterial für die nachfolgende Fettsäureanalyse der klassifizierten Fette wurde ein hohes Probenvolumen gewählt (800 μl , entspricht 80 mg), das zum Beladen von zwei Glasplatten aufgeteilt wurde (jeweils 20 Punkte à 20 μl = 400 μl pro Platte). Die Chromatographie wurde mit einem Lösungsmittelsystem aus Chloroform, Methanol, Eisessig und Aqua dest. (90 : 7 : 1 : 0,7) in einem abgeschlossenen Tank durchgeführt. Nach Beendigung der Chromatographie wurden die Platten zur Darstellung der Banden mit 2,7-Dichlorofluorescein in 98 %igem Methanol besprüht und mit dem UV-Sichtsystem beurteilt. Die den Standards entsprechenden fluoreszierenden Banden der Phospholipide, Ceramide, Cholesterinester und Triacylglyceride wurden markiert und getrennt voneinander von der Platte gekratzt, wobei die Produkte der zwei Glasplatten einer Probe zusammengefasst wurden. Die so klassifizierten Fette wurden dreimalig mit Chloro-

form / Methanol (2 : 1) unter Druck aus dem Kieselgel gelöst (siehe Kapitel 8.6.1.) und in einem vorgewogenen, sauberen Glaskolben gesammelt. Nach rotierender Verdampfung wurden die Glaskolben gewogen. Die Proben wurden daraufhin nach der oben beschriebenen Methode zur gaschromatographischen Analyse der nonOH-Fettsäuren weiterverarbeitet. Abweichend von dieser Methodik wurden die Volumina bei der weiteren Prozessierung zur Minimierung von Verlusten und Verunreinigungen durch die Lösungsmittel so gering wie möglich gehalten. Im Anschluss an die Transmethylierung wurden die Proben daher dreimalig mit nur 10 ml Hexan ausgewaschen, nach Verdampfung in nur 1 ml Hexan resuspendiert, unter Stickstoff erneut verdampft und zur Trennung der nonOH- und OH-Fettsäuren in 200 µl Hexan gelöst. Am Ende der Aufbereitung wurde die zu analysierende Probe schließlich in 50 µl Hexan gelöst und bis zur Analyse kühl gelagert.