3 Material und Methoden

3.1 Versuchsplanung und Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Im Auftrag des niederländischen Unternehmens *DSM Nutritional Products* (Grenzach-Wyhlen, Germany), Nachfolger der „Division Vitamine und Feinchemikalien“ der Firma Roche, sollen die Auswirkungen des Einsatzes zweier NSP-spaltender Enzympräparate im Vergleich betrachtet werden. Eingesetzt werden das Monoenzympräparat *Ronozyme WX* und der Multienzymkomplex *Roxazyme G2*.

Besonderes Augenmerk gilt den mikrobiellen Stoffwechselprodukten im Magen-Darm-Trakt des Ferkels unter Enzymsupplementation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso sollen die Auswirkungen des Enzymzusatzes auf die Digestaviskosität und die Verdaulichkeit der Hauptnährstoffe sowie mögliche Leistungssteigerungen bei den enzymsupplementierten Fütterungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht werden.

Um dies genauer zu untersuchen, werden sowohl *„in-vitro“*-Versuche als auch ein Fütterungsversuch als *„in-vivo“*-Experiment durchgeführt.

3.2 „In vitro“ Wachstumsversuch mit Magen-, Jejunal- und Coloninhalt und verschiedenen NSP-reichen Extrakten als Substrat

3.2.1 Herstellung NSP-reicher Extrakte aus Weizen

Ziel war es, Extrakte aus Weizenschrot herzustellen, die reich an Nicht-Stärke-Polysacchariden sein sollten. Diese NSP-reichen Extrakte fungierten anschließend zum Teil in *„in vitro“* Wachstumsversuchen als Substrate für intestinale Bakterien, wobei der Abbau der Extrakte unter Zusatz von *Ronozyme WX* bzw. *Roxazyme G2* betrachtet werden sollte.
Es wurden drei verschiedene NSP-Fraktionen hergestellt:

1.) bei 37°C in Wasser lösliche NSP

2.) bei 70°C in Wasser lösliche NSP

3.) bei 70°C in alkalischem Milieu (5%-ige NaOH) lösliche NSP

Zur Veranschaulichung ist der gesamte Extraktionsvorgang in Abbildung 5 in einem Fließschema dargestellt:

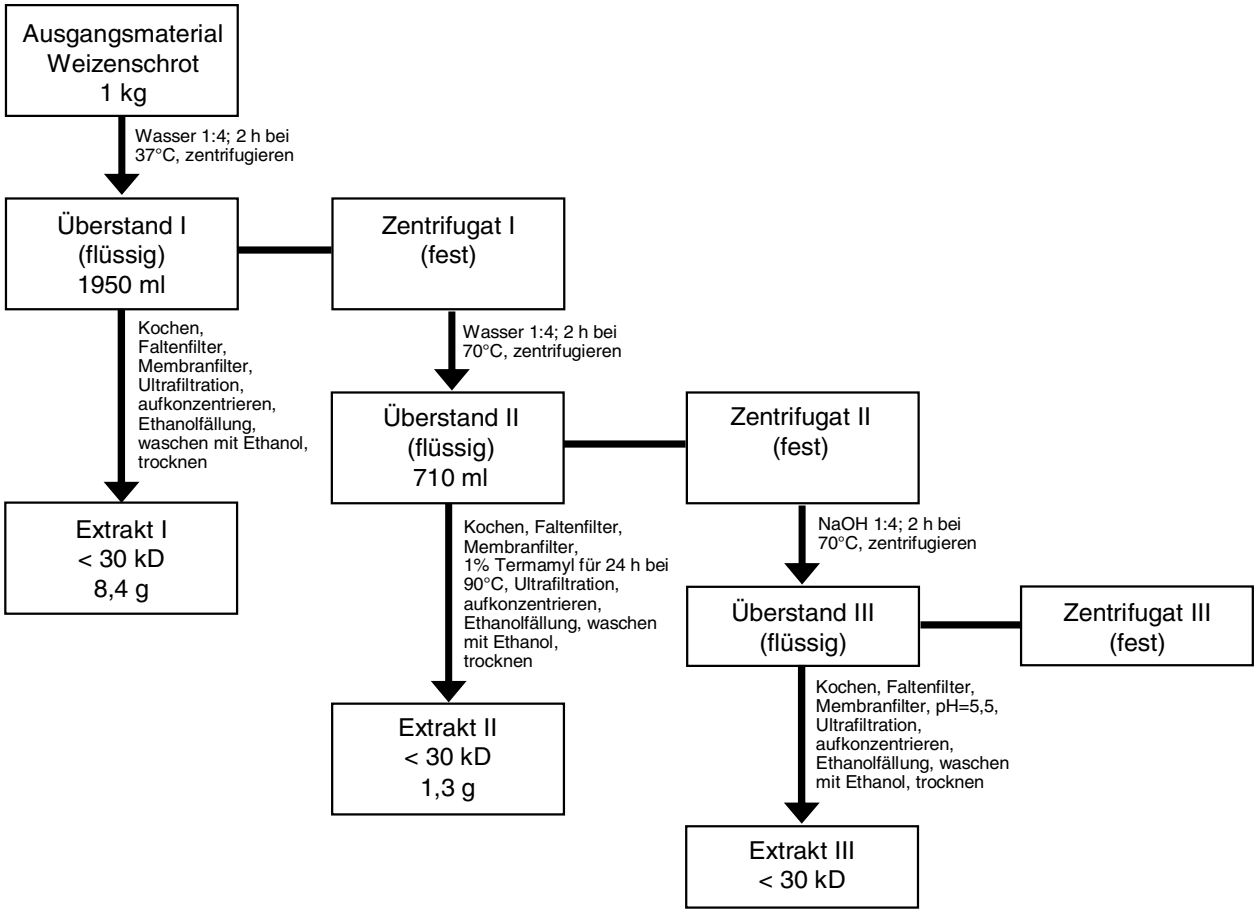

Abbildung 5: Fließschema zum Extraktionsvorgang

Ein Kilogramm Weizenschrot wurde 1:4 mit Wasser verdünnt, 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad (julabo sw-20c, Julabo, Seelbach, Germany) inkubiert, währenddessen alle 15 min per Hand geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde (Kühlzentrifuge SORVALL RC 5 B Plus, Sorvall, Langenselbold, Germany) zentrifugiert (10 min bei 8000 *g* und 4°C). Das bei diesem Zentrifugationsvorgang entstandene Zentrifugat I wurde zunächst für die Herstellung der weiteren NSP-Fraktionen im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Der Proteingehalt des ebenfalls bei dieser Zentrifugation entstandenen sogenannten Überstandes I (flüssig) wurde mit der Methode zur *Proteinbestimmung nach Bradford* photometrisch (Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) ermittelt. Des weiteren wurde der Gehalt an reduzierenden Zuckern photometrisch mittels Dinitrosalicylsäure-Reagenz (DNSS) bestimmt. Der Überstand I wurde anschließend -zwecks Denaturierung der noch enthaltenden Proteine- 10 min bei 100°C gekocht, durch einen Faltenflter (Whatman Schleicher&Schuell, Durchmesser 24 cm, 595½, Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) gefiltert und danach nochmals mittels Vakuumpumpe durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Whatman Schleicher&Schuell, Membranfilter ME 25; 0,45 µm, Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) filtriert. Auch hiernach wurde der Proteingehalt mit der *Bradford*-Methode sowie der Gehalt an reduzierenden Zuckern mittels Dinitrosalicylsäure-Reagenz (DNSS) bestimmt. Anschließend wurde der Überstand I mit einem Vivaflow 200-Modul auf eine Molekülgröße kleiner 30 kD ultrafiltriert (Vivaflow 200 Membran: Vivascience AG, Hannover, Germany; Pumpe: Millipore CAT NO XX80 EL0 04 easy-load^{TM} Masterflex, Millipore, Schwalbach, Germany). Nach der Ultrafiltration wurde der Proteingehalt und der Gehalt an reduzierenden Zuckern erneut mit obigen Methoden photometrisch bestimmt. Der ultrafiltrierte Überstand I wurde nun über Nacht bei 70°C im Umluft-Trockenschrank (Heraeus instruments, Düsseldorf, Germany) durch Eintrocknen aufkonzentriert. Der aufkonzentrierte, ultrafiltrierte Überstand I wurde mit möglichst wenig Wasser angelöst, 1:5 mit reinem Ethanol versetzt und über Nacht im Kühlschrank bei +4°C gefällt. Die durch die Ethanolfällung ausgefallene, gummiartige Masse wurde zentrifugiert (10 min bei 8000 *g* und 4°C). Der flüssige Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zentrifugat (fest) mit 70%-igem Ethanol versetzt, um anschließend erneut zentrifugiert zu werden (10 min bei 8000 *g* und 4°C). Der flüssige Überstand wurde verworfen und das nun entstandene Pellet wurde im Umluft Trockenschrank bei 70°C vollständig getrocknet. Der Zustand der vollständigen Trocknung wurde per Wägung ermittelt (Gewichtskonstanz). Das vollständig getrocknete Pellet I, welches nun als gekochtes,

ultrafiltriertes Extrakt I bezeichnet wird, wurde gemörsert und im Exsikkator unter Lichtabschluß gelagert.

Das zunächst im Kühlschrank bei 4 °C gelagerte Zentrifugat I wurde zur Gewinnung der nächsten NSP-Fraktion mit Wasser im Verhältnis 1:4 verdünnt, 2 Stunden bei 70°C im Wasserbad inkubiert und währenddessen alle 15 min per Hand geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zentrifugiert (10 min bei 8000 *g* und 4°C). Das bei diesem Zentrifugationsvorgang entstandene Zentrifugat II wurde zunächst für die Herstellung der weiteren NSP-Fraktion im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Der ebenfalls bei diesem Zentrifugationsvorgang enstandene Überstand II wurde anschließend genauso wie Überstand I behandelt mit dem einzigen Unterschied, dass er vor der Ultrafiltration zu 1 % mit Termamyl (Novonordisk, Mainz, Germany) versetzt und für 24 Stunden bei 90°C inkubiert wurde, um Ultrafiltrationsfähigkeit zu erreichen. Das vollständig getrocknete, gekochte, ultrafiltrierte Extrakt II wurde gemörsert und im Exsikkator unter Lichtabschluß gelagert.

Das zunächst im Kühlschrank bei 4°C gelagerte Zentrifugat II wurde zur Gewinnung der nächsten NSP-Fraktion mit 5%-iger Natronlauge im Verhältnis 1:4 verdünnt, 2 Stunden bei 70°C im Wasserbad inkubiert und währenddessen alle 15 min per Hand geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zentrifugiert (10 min bei 8000 *g* und 4°C). Das bei diesem Zentrifugationsvorgang entstandene, Zentrifugat III wurde nicht weiterverarbeitet. Der ebenfalls bei dieser Zentrifugation entstandene Überstand III wurde anschließend genauso wie Überstand I behandelt, allerdings wurde vor der Ultrafiltration der pH-Wert des Überstandes III mittels 25%-iger Salzsäure auf pH 5,5 eingestellt. Das vollständig getrocknete, gekochte, ultrafiltrierte Extrakt III wurde gemörsert und ebenfalls im Exsikkator unter Lichtabschluß gelagert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in „in vitro“ Wachstumsversuchen mit Magen-, Jejunal- und Coloninhalt nur die bei 37°C in Wasser lösliche, nicht ultrafiltrierte NSP-Fraktion (Weizen-Extrakt I >30 kD) und die dazugehörige ultrafiltrierte Fraktion (Weizen-Extrakt I <30 kD) als Substrat eingesetzt.

3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford und DNSS-Test zum Nachweis reduziernder Zucker zur Charaktersisierung der NSP-reichen Extrakte

Die Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung erfolgt beim Nachweisverfahren nach *Bradford* dadurch, dass sich der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 äquimolar an Proteine anlagert. Die dadurch eintretende Absorptionsänderung wird als Maß für den Proteingehalt der Lösung verwendet und photometrisch gemessen.

Der sogenannte *DNSS-Test* zum Nachweis reduzierender Zucker dient der indirekten Bestimmung von NSP-spaltenden Enzymen in Lösungen. Bei Enzymaktivität werden Zucker mit reduzierenden Enden freigesetzt, welche mit Hilfe des Dinitrosalicylsäure (DNSS)-Reagenzes photometrisch über eine Glucose-Standardreihe detektiert werden können.

3.2.3 „In vitro“ Inkubation der NSP-reichen Extrakte mit Magen-, Jejunal- und Colondigesta

Die Substrate wurden den Minimal-Nährmedien (siehe Anhang) zu 1% zugesetzt. Die Enzymlösungen wurden mit einer Konzentration von jeweils 100 mg / ml Rono- bzw. Roxazyme hergestellt. Den mitgeführten Kontrollen wurde, anstelle des jeweiligen Enzymes, Bis-Tris-Puffer (pH 6,0) zugesetzt.

Es erfolgte eine Vorinkubation der Substratmedien mit den Enzymlösungen unter Schütteln für 1 Stunde bei 37°C.

Anschließend wurden die kontroll- bzw. enzyminkubierten Substratmedien auf Mikrotiterplatten vorgelegt und die in Ringer-I-Lösung verdünnten Digestaproben von Magen, Jejunum und Colon (die jeweilige Digestaprobe wurde zu diesem Zweck jeweils 3-fach aufgeteilt) in Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-4} zugegeben. Nach Ermittlung eines sogenannten Null-Stundenwertes für die optische Dichte OD [nm] per Trübungsmessung im Mikrotiterplattenlesegerät (MR 7000, Dynatech, Denkendorf, Germany) wurden die Mikrotiterplatten für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24 h wurde erneut gemessen. Die Meßwellenlänge betrug 690 nm. Die optische Dichte diente als Maß für das Bakterienwachstum. Zur Ermittlung des Bakterienwachstums wurden die Null-Stundenwerte der optischen Dichte von denjenigen Werten, die nach 24 h ermittelt worden waren, subtrahiert. Die Digestaproben stammten von einem acht Wochen alten Ferkel aus dem Tierbestand des Institutes für Tierernährung. Gefüttert worden war dieses Tier mit einer Diät auf Basis von Weizen (57 %), Gerste (13 %) und Soja (23 %).

3.3 Fütterungsversuch zur Ermittlung von Leistungsparametern

3.3.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Zur Durchführung des Fütterungsversuches wurden 60 Absetzferkel, zu gleichen Teilen männliche und weibliche Tiere, im Alter von 21 Lebenstagen von der Firma Schaumann zugekauft. Es handelte sich hierbei um Hybridschweine der Rasse *EUROC* (Large White ♀ x Duroc ♂).

Die Tiere wurden, wie aus Tabelle 4 ersichtlich, in drei Versuchsgruppen (Kontrollgruppe: ohne Enzymsupplementation; Multienzympräparat-Gruppe: 100 mg/kg *Roxazyme G2* und Monoenzympräparat-Gruppe: 200 mg/kg *Ronozyme WX*) mit jeweils 20 Tieren aufgeteilt.

Tabelle 4:

	Kontroll-Gruppe	**Multienzympräparat-Gruppe**	**Monoenzympräparat-Gruppe**
Roxazyme G2 [mg/kg]	0	100	0
Ronozyme WX [mg/kg]	0	0	200
Tierzahl	20	20	20
männl./weibl.	10/10	10/10	10/10

Die Unterbringung erfolgte einstreulos mit zunächst jeweils zwei Tieren pro Box (je ein männliches und ein weibliches Ferkel; 2 m^2 große Boxen) in den Versuchsställen des Institutes für Tierernährung der Freien Universität Berlin. Nach vierwöchiger Leistungsphase wurden 28 Tiere für den Versuchsabschnitt zur Ermittlung der praecaecalen Verdaulichkeit in der weiter unten beschriebenen Weise umgestallt. Pro Box war fortan nur noch ein Tier aufgestallt.

Zur Verfügung standen ein großer Stall mit 18 Versuchsboxen und ein kleinerer Stall mit insgesamt 14 Versuchsboxen innerhalb ein und desselben Stallkomplexes mit gleichen klimatischen Bedingungen. Die Versuchsboxen wurden alternierend der Kontroll-Gruppe, der Multienzympräparat-Gruppe oder der Monoenzympräparat-Gruppe zugeordnet, damit sogenannte Stalleffekte ausgeschlossen werden können. Während des gesamten Versuchs herrschte eine mittlere Stalltemperatur von 24,4 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 65%. Das Lichtprogramm gewährleistete eine sechzehnstündige Lichtphase und acht Stunden Dunkelheit.

Der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Fütterungsversuch lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen. Zunächst wurde mit 60 Tieren ein vierwöchiger Leistungsversuch durchgeführt. Die Tiere wurden während dieses Zeitraumes einmal wöchentlich gewogen und auch das Futter wurde einmal wöchentlich rückgewogen.
Daraus resultierend wurden boxenweise (zwei Tiere pro Box, keine Einzeltierzuordnung möglich) folgende zootechnische Leistungsparameter erhoben:

- Lebendmasse
- Lebendmassezunahme
- Futterverzehr
- Futteraufwand = Futterverzehr/Lebendmassezunahme
- Kotkonsistenz

Die Rationen und auch das Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

Dieser Leistungsabschnitt mündete unmittelbar in einen neuntägigen Versuchsabschnitt zwecks Bestimmung der praecaecalen Verdaulichkeit mit nur noch 28 Tieren. Die Tiere waren nun einzeln eingestallt. Die 28 Tiere für den Verdaulichkeitsversuch wurden in der Weise umgestallt, dass alle weiblichen Tiere in ihren bisherigen Boxen blieben, während die männlichen Tiere in eine neue Box umgesetzt wurden. Dabei wurde so verfahren, dass ein männliches Tier welches zuvor zum Beispiel in einer Box der Kontroll-Gruppe war auch wieder in eine „Kontrollgruppenbox“ umgesetzt wurde. Männliche Tiere der Multienzympräparat-Gruppe kamen wieder in eine „Multienzympräparat-Box“ und männliche Tiere der Monoenzympräparat-Gruppe in eine „Monoenzympräparat-Box“. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Tiere nicht mit den Fäkalien bzw. Fäkalienresten von Tieren einer anderen Fütterungsgruppe in Berührung kommen.
Auch während dieses Versuchsabschnittes wurde die Kotkonsistenz beurteilt, um eventuell auftretendes Durchfallgeschehen zu erkennen. Die Diäten (incl. Supplementation), waren zu 0,5% mit Chromoxid versetzt. Im Versuchsabschnitt zur Ermittlung der praecaecalen Verdaulichkeit wurde nicht mehr ad libitum, sondern rationiert gefüttert. Die Tiere erhielten fünfmal täglich jeweils 200g der chromversetzten Diät. Also ein Kilogramm Futter als Tagesration.

3.3.2 Zusammensetzung der eingesetzten Diäten

Als Diät wurde über den gesamten Versuchszeitraum, d.h. während beider Versuchsabschnitte, eine weizenbasierte, bedarfsdeckende Diät mit einem Energiegehalt von 13,0 MJ ME und 18,5 % Rohprotein eingesetzt. Als alleinige Eiweißquelle diente NSP-freies Kartoffeleiweiß (Siehe auch Tabelle 5). Diese Grunddiät wurde bei der Kontroll-Gruppe unverändert, und bei den beiden Versuchsgruppen um das Enzympräparat mit dem Handelsnamen *Roxazyme G2* bzw. *Ronozyme WX* ergänzt (DSM Nutritional Products Germany, Grenzach-Wyhlen, Germany), eingesetzt. Die Diät wurde in pelletierter Form verfüttert.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Grunddiät:

Rationskomponente	**prozentualer Anteil**
Weizen, Sorte „Alidos“*$_1$	72,42
Weizenkleie	10,70
Monocalciumphosphat	1,79
Kohlensaurer Futterkalk	1,97
Lysinhydrochlorid	0,22
Sojaöl	1,00
Kartoffeleiweiß	10,70
Praemix*$_2$	1,20

*$_1$ Extraktviskosität 2,1 [mPa s]
*$_2$ Inhaltsstoffe je kg Praemix (Eigenmischung des Institutes für Tierernährung, FU Berlin)
1000000 IE Vit A; 40000 IE Vit D3; 4000 mg Vit E; 240 mg Vit K3; 200 mg Vit B1; 650 mg Vit B6; 6600 mg Niacin; 400 mg Vit B6; 3000 µg Vit B12; 20000 µg Biotin; 1800 mg Pantothensäure; 150 mg Folsäure; 50000 mg Cholinchlorid; 8000 mg Zn; 5000 mg Fe; 8500 mg Mn; 1500 mg Cu; 100 mg Co; 40 mg Se; 160 g Na; 50 g Mg

3.3.3 Bestimmung der Extraktviskosität des in der Grunddiät verwendeten Weizens (Sorte „Alidos“)

5 g zermahlene Probe (Partikelgröße 0,25 mm) wurden in 10 ml Bis Tris Puffer gelöst, der pH-Wert auf 6,0 eingestellt und für 30 min bei 40 °C im Schüttelinkubator (Multi Reax, Heidolph instruments, Schwabach, Germany) inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 10000 *g* zentrifugiert. Diese Überstände wurden zur Viskositätsbestimmung herangezogen. Die Viskosimetrie erfolgte wie unter Gliederungspunkt 3.6 beschrieben.

3.3.4 Angaben zum Pelletiervorgang

Die Enzympräparate wurden vor dem Pelletiervorgang mit einem Teil des Weizens vorvermischt.
Die gesamte Grunddiät (für die beiden Enzymgruppen incl. Supplementation) wurde nach Konditionierung mit Wasserdampf (bei 60 °C für 15 s) durch eine Ringpresse gepreßt und pelletiert (Durchmesser 2,5 mm und Tiefe 100 mm).

3.3.5 Beurteilung der Kotkonsistenz

Die Kotkonsistenz wurde einmal täglich nach einem Beurteilungsschlüssel entsprechend Tabelle 6 beurteilt und notiert.

Tabelle 6: Beurteilungs-Schlüssel für die Kotkonsistenz:

Codierung	**Kotkonsistenz**	**Beurteilung**
1	fest, trocken	physiologisch
2	weich, geformt	physiologisch
3	pastös, ungeformt	beginnender Durchfall
4	dünnbreiig, zerfließend	Durchfall
5	flüssig mit Stückchen	schwerer Durchfall

3.3.6 Digestaprobennahme für die Laboruntersuchungen

Nach Ablauf des Verdaulichkeitsversuchs wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen 18 der verbliebenen 28 Tiere, zu gleichen Teilen männliche und weibliche, zunächst mit Stresnil (Azaperon; Janssen-Cilag, Neuss, Germany) und Ursotamin (Ketaminhydrochlorid, 10%-ig; Serumwerk Bernburg AG, Germany) sediert und anschließend mit T61 (Hoechst-Roussel-Vet, Frankfurt, Germany) getötet.
Bei diesen acht Wochen alten Tieren (Lebenstag 54-57) wurde unmittelbar nach Eintritt des Todes die Bauchhöhle in der *Linea alba* eröffnet. Dann wurde das Ileum gesucht und dessen Anfang, kenntlich durch den Beginn der *Plica ileocaecalis*, mittels zweier Arterienklemmen abgeklemmt. Von dort ausgehend wurden mit einem Maßband 200 cm in Richtung proximal abgemessen, um auch dort eine Klemme zu setzen. Dann wurde der Darm zwischen den beiden Klemmen am Beginn des Ileums durchschnitten und der Inhalt des 200 cm langen Dünndarmabschnittes in ein steriles Probengefäß herausmassiert. Diese Digestaproben wurden später u.a. zur Bestimmung der praecaecalen Verdaulichkeit herangezogen.
Als nächste Probe wurde der Inhalt eines 20 cm langen Abschnittes des proximalen Colon ascendens gewonnen.
Bei der dritten Probe handelte es sich um Mageninhalt, der ebenfalls in einem sterilen Probengefäß aufgefangen wurde.
Alle drei Digestaproben wurden unmittelbar nach der Entnahme auf Eis gestellt, aliquotiert und anschließend sofort bei minus 80 °C eingefroren.

3.3.7 Lyophilisierung der Digestaproben für die Weender Analyse und für die Bestimmung des Aminosäure- und Stärkegehaltes

Für die Bestimmung der Aminosäuren, der Stärke und für die Durchführung der Weender Analyse wurden die Digestaproben gefriergetrocknet (Lyovac GT2, Leybold-Heraeus, Köln, Germany) und gemahlen auf eine Partikelgröße von 0,25 mm (Retsch ZM100, Retsch, Haan, Germany).
Für alle anderen Bestimmungen wurde Feuchtmaterial verwendet.

3.4 pH-Wert-Bestimmung in den Magendigesta

Der pH-Wert wurde für den Verdauungsabschnitt Magen mittels Indikatorpapier (Merck, Darmstadt, Germany) bestimmt.

3.5 Agardiffusionstest zum qualitativen Nachweis der Aktivität NSP-spaltender Enzyme in den Magen- Jejunal- und Colondigesta

Die Methode wurde von Wood (1981) beschrieben und des weiteren für Untersuchungen verschiedenster Ausgangsmaterialien modifiziert (Edney *et al.* 1986; Walsh *et al.* 1995; Wood *et al.* 1988).

Ziel des Agardiffusionstestes war es, NSP-spaltende Enzymaktivitäten in den Digestaproben nachzuweisen. Der Farbstoff Kongorot geht starke Bindungen zu Polysacchariden ein, die aufeinanderfolgende ß-(1,4)- bzw. ß-(1,3)-Glucopyranosid-Einheiten besitzen. Werden die Polysaccharide infolge Enzymaktivität teilweise hydrolysiert, so bestehen zwischen den jeweiligen Oligosacchariden und dem Kongorot geringe oder gar keine Wechselwirkungen mehr. Dadurch kann der Farbstoff in Bereichen des enzymatischen Abbaus nicht mehr binden und kann durch 1 M Natriumchloridlösung aus dem Agar ausgewaschen werden. Die auf den Flächen des enzymatischen Abbaus entstehenden Lysezonen kann man als qualitativen Nachweis für die Enzymaktivität werten (Teather und Wood 1982; Wood *et al.* 1988).

3.5.1 Herstellung des Substrat-Agars

Als Substrate dienten (1,3-1,4)-ß-D-Glucan aus Gerste, (1,4)-ß-Arabinoxylan aus Weizen, (1,4)-ß-Galactomannan vom Affenbrotbaum sowie (1,4)-ß-Arabinogalactan aus Kartoffel als Quelle (alle Firma Megazyme, Ireland).

Zunächst wurden die vier Substratlösungen mit einer Substratkonzentration von jeweils 0,5 mg/ml hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Substrat in 20 mM Bis-Tris Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle und Rühren auf dem Magnetrührer vollständig gelöst und anschließend der pH-Wert auf pH 6,0 eingestellt. Anschließend wurde, ebenfalls unter Erhitzen und Rühren, 1,7 g Gelrite (Roth GmbH, Karlsruhe) / 100 ml Substratlösung als Agar-Ersatz zugesetzt und die nun fertigen Lösungen sofort auf einer ebenen Unterlage, luftblasenfrei in vier 20 x 30 cm große Polyacrylschalen gegossen. Dabei wurde, durch Verwendung eines Meßzylinders zum Gießen, darauf geachtet, dass die Schichtdicke des Agars jeweils gleich dick wurde. Die vier Polyacrylschalen wurden zum Erstarren des Agars für 1,5 h in den Kühlschrank bei +4°C gestellt. Nach dem Erkalten wurden mittels eines

Korkbohrers von 6 mm Durchmesser jeweils 18 Löcher für das Auftragen der Proben in jeden der vier Agar gebohrt.

3.5.2 Vorbereitung der Digestaproben für den Agardiffusionstest

Die drei Digestaproben eines jeden Tieres (Magen, Jejunum, Colon) wurden zunächst aufgetaut, anschließend zentrifugiert (1 min bei 9000 *g* und 4 °C) und jeweils 100 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß abpipettiert, 1+4 mit Bis-Tris Puffer verdünnt und aus arbeitstechnischen Gründen erneut bei minus 80°C eingefroren.
In jedes der ausgestanzten Löcher wurden jeweils 50 µl des verdünnten, erneut aufgetauten Digestaüberstandes gegeben und die vier Polyacrylschalen anschließend für 28 h bei 40° C im Brutschrank inkubiert.
Nach Inkubation wurden die Agar mit 0,2% -iger Kongorotlösung für max. 2 ½ Stunden gefärbt und danach eine Stunde lang mit 1 M NaCl entfärbt, um die Lysezonen sichtbar zu machen.

3.5.3 Auswertung der Lysezonen

Der jeweilige Substrat-Agar wurde in einem definierten Abstand mit einer Digitalkamera photographiert und die so dokumentierten Lysezonen mit Hilfe des Computer-Programmes PCBAS (Version 2.08a; Raytest, Straubenhardt) vermessen

3.6 Viskosimetrie der Digestaproben

Die Digesta von Magen, Jejunum und Colon wurden sofort nach der Entnahme zentrifugiert (10 min bei 9000 *g* und 4 °C), die Überstände überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Zwischen Probenentnahme und Viskositätsmessung verging eine dreiviertel Stunde. Die so aufbereiteten Proben wurden im Rotationsviskosimeter (Brookfield Digital Viscosimeter Cone / Plate DV-II+, Brookfield Engineering Laboratories, Lorch, Germany) in einer auf 40 °C temperierten Meßkammer in [mPa s] gemessen.

3.7 Bestimmung bakterieller Metaboliten

3.7.1 Bestimmung freier Ammoniumionen

Die Bestimmung der Ammoniakkonzentration geschah mit Hilfe einer ionenselektiven Elektrode der Firma Mettler Toledo (Mettler Toledo Electrode, Type No.: 51340910, Mettler Toledo ISE Combination, AMMONIUM, Mettler Toledo GmbH, Gießen, Germany).
Die Digestaproben wurden aufgetaut, zu jeweils 0,5 g abgewogen, auf Eis gehalten, mit jeweils 500 µl Wasser verdünnt und durch Mischen (VORTEX-GENIE 2, Scientific instruments, West Palm Beach, USA) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min bei 9000 *g* und 4 °C). Der Überstand wurde jeweils in neue Probengefäße überführt, mit jeweils 500 µl 1 M Natronlauge verdünnt und mit jeweils 200 µl Aluminiumsulfatlösung (0,9 mol/l; Mettler Toledo GmbH, Gießen, Germany) sowie jeweils 10 ml Wasser versetzt. Nach erneutem Homogenisieren erfolgte die Messung mit der zuvor kalibrierten, ionenselektiven Elektrode.

3.7.2 Lactatbestimmung

Die Bestimmung des D- und L-Lactats erfolgte mit einem kommerziellen Lactat-Test-Kit im UV-Bereich (Boehringer, Mannheim, Germany). Die Bestimmung erfolgte mit folgender Modifikation:
Die Digestaproben wurden mit 1 N Perchlorsäure deproteinisiert. Nach Zugabe von 4 N Kalilauge und Zentrifugation (5 min bei 9000 *g*) wurden die Überstände für die Bestimmung herangezogen.
Zur photometrischen Messung wurde das Programm Swift quantification II (Biochrom 1999, Cambridge, UK) verwendet.

3.7.3 Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren

Die Digestaproben wurden mit Oxalsäure (0.1 mol/l), die Capronsäure (0.5 mmol/l) als internen Standard enthielt, versetzt und homogenisiert. Der Gehalt von Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure und Valeriansäure wurde gaschromatographisch nach einer Methode von *Schäfer* (1995) aus den Überständen nach Zentrifugation (10 min bei 9000 *g*) ermittelt. Dabei wurde ein Gaschromatograph (Agilent 6890, Agilent, Waldbronn, Germany) mit einer Kapillarsäule (Innovax 30m x 530µm x 0.1µm) verwendet.

3.7.4 Gallensäure-Bestimmung

Die Gallensäuren wurden nach vorheriger Probenvorbereitung (Extraktion und Reinigung mit Festphasenkartuschen, Strata-X 100mg / 6ml; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) mittels HPLC (Dionex, Idstein, Germany) auf einer stationären Phase (CarboPacPA 100) getrennt. Sie wurden nach isokratischer Elution mit 100 mM NaOH und 0,9 M Natriumacetat und 15 %-igem Aceton mit einem gepulsten amperometrischen Detekor (Dionex, Idstein, Germany) nachgewiesen und mit den internen Standards Cholsäure, Taurocholsäure und Glykocholsäure quantifiziert.

3.8 Bestimmung des Markers Chromoxid für die spätere Berechnung der praecaecalen Verdaulichkeiten

Die Bestimmung des Markers Chromoxid erfolgte in den Digestaproben aus Magen; Jejunum und Colon mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAF Vario 6, Analytik-Jena, Jena, Germany) (Arthur 1970). Dazu wurden die Proben zunächst 4 h bei 600 °C im Muffelofen verascht und mittels eines Gemisches aus Phosphor- und Schwefelsäure nach *Costigan und Ellis* (1987) aufgeschlossen.

3.9 Weender Analyse, Bestimmung der Aminosäure- und Stärkegehalte sowie Berechnung der praecaecalen Verdaulichkeit

Anhand der Jejunaldigesta wurden mittels Weender Analyse die Rohnährstoffe Rohprotein, Rohfett, Rohfaser, Rohasche sowie ADF und NDF bestimmt und anschließend deren praecaecale Verdaulichkeit berechnet. Hierzu wurden die jeweiligen VDLUFA-Methoden verwendet (Naumann *et al.* 1988).

Des weiteren wurden die Aminosäuren Asparagin, Threonin, Serin, Glutamin, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Lysin, Arginin und Prolin sowie Methionin und Cystein bestimmt und anschließend deren praecaecale Verdaulichkeit berechnet. Hierzu wurde ebenfalls nach den Angaben der VDLUFA (Naumann *et al.* 1988) gearbeitet. Die Proben wurden mit 6 N Salzsäure (22 h bei 110°C) hydrolysiert, und der pH-Wert der Hydrolysate auf pH 2,2 eingestellt. Danach wurden die Aminosäuren in einem Aminosäureanalysator des Typs Biochrom 20 Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) durch Ionenaustauscher-Chromatographie getrennt und anschließend bestimmt. Im Falle der Bestimmung der Aminosäuren Methionin und Cystein ist vor der Hydrolyse eine Oxidation (mittels Wasserstoffperoxid, Ameisensäure und Pheol; 24 h bei 0 °C) notwendig gewesen und durchgeführt worden.

Der Stärkegehalt wurde mittels eines kommerziellen UV-Test-Kits (Firma Boehringer, Mannheim, Germany) ermittelt und anschließend die praecaecale Verdaulichkeit der Stärke berechnet.

Die Berechnung der Werte für die praecaecale Verdaulichkeit erfolgte für die Rohnährstoffe (inklusive ADF- und NDF), die Aminosäuren und die Stärke nach Formel (I) unter Berücksichtigung der Werte der Chromoxidbestimmung:

(I) Praecaec. Verd.[%] = 100 - (Chromoxid $_{Diät}$ /Chromoxid $_{Digesta}$) x (Nährstoff $_{Digesta}$/Nährstoff$_{Diät}$) x 100