

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

***In vitro* Untersuchungen zum Einfluss  
von *Yucca schidigera* und Inulin auf die  
Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität  
der fäkalen Mikrobiota von proteinreich  
und -arm gefütterten Hunden**

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

vorgelegt von  
**Luisa Vierbaum**  
Tierärztin aus Moers

Berlin 2019  
Journal-Nr.: 4176







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

***In vitro* Untersuchungen zum Einfluss von *Yucca schidigera* und Inulin auf die  
Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der fäkalen Mikrobiota von proteinreich  
und -arm gefütterten Hunden**

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

vorgelegt von Luisa Vierbaum  
Tierärztin aus Moers

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4176

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. Barbara Kohn  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Christine Iben

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

dogs; dog feeding; animal nutrition; feeds; fermentation; digestion; yucca schidigera;  
inulin; microbial flora; dog faeces; faeces composition; faeces examination; lactic acid;  
amines; pH; polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 16.12.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-96729-031-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

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 2019

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Meinen Eltern*



---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Zusammensetzung und Einflussfaktoren der Mikrobiota des caninen Verdauungstraktes .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Zusammensetzung der Mikrobiota des caninen Verdauungstraktes.....	2
2.1.2 Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung der Mikrobiota des caninen Verdauungstraktes .....	4
<b>2.2 Stoffwechsel von Makronährstoffen durch die canine intestinale Mikrobiota..</b>	<b>8</b>
2.2.1 Bakterielle Fermentation von Kohlenhydraten .....	8
2.2.2 Bakterielle Fermentation von Protein.....	9
2.2.3 Einflussfaktoren auf die bakterielle Fermentation von Protein .....	16
<b>2.3 <i>Yucca schidigera</i>.....</b>	<b>18</b>
2.3.1 Gewinnung und Zusammensetzung von <i>Yucca schidigera</i> .....	18
2.3.2 Einsatz von <i>Yucca schidigera</i> in der Tierernährung.....	19
2.3.3 Wirkungen von <i>Yucca schidigera</i> beim Hund .....	20
<b>2.4 Inulin .....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Gewinnung und chemische Struktur von Inulin.....	24
2.4.2 Einsatz von Inulin in der Tierernährung .....	24
2.4.3 Wirkungen von Inulin beim Hund.....	26
<b>2.5 <i>In vitro</i> Dickdarm Digestions- und Fermentationsmodelle.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 Versuchsziel und Fragestellung.....</b>	<b>37</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Fütterungsversuch.....</b>	<b>38</b>
3.1.1 Roh Nährstoffbestimmung der Diäten .....	38
3.1.2 Tiere.....	38
3.1.3 Haltung .....	39

3.1.4	Probenentnahme.....	39
3.1.5	Rohnährstoffbestimmung der Kotproben.....	39
3.1.6	Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota der Kotproben.....	40
<b>3.2</b>	<b><i>In vitro</i> Fermentationsmodell (statisches Kurzzeitinkubationssystem).....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Aufbau und Durchführung der <i>in vitro</i> Fermentation.....	41
3.2.2	Probengewinnung und Präparation.....	43
<b>3.3</b>	<b>Analyse bakterieller Metaboliten der fäkalen Mikrobiota.....</b>	<b>44</b>
3.3.1	Bestimmung des pH-Werts.....	44
3.3.2	Bestimmung von Ammonium.....	44
3.3.3	Bestimmung von SCFA und BCFA.....	45
3.3.4	Bestimmung von D- und L-Laktat.....	46
3.3.5	Bestimmung von biogenen Aminen.....	47
3.3.6	Bestimmung von Phenol- und Indolverbindungen.....	48
<b>3.4</b>	<b>Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota des Fermentationszentrifugats.....</b>	<b>50</b>
3.4.1	DNA-Extraktion aus dem Fermentationszentrifugat.....	50
3.4.2	Bestimmung der dsDNA-Konzentration der Extrakte.....	51
3.4.3	Prinzip und Durchführung der qPCR.....	51
<b>3.5</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Rohnährstoffanalyse.....</b>	<b>55</b>
4.1.1	Nährstoffgehalte der Diäten.....	55
4.1.2	Nährstoffgehalte der Kotproben.....	55
<b>4.2</b>	<b>Bakterielle Metaboliten der fäkalen Mikrobiota.....</b>	<b>55</b>
4.2.1	Ergebnisse der Bestimmung des pH-Werts.....	56
4.2.2	Ergebnisse der Bestimmung von Ammonium.....	56
4.2.3	Ergebnisse der Bestimmung von SCFA und BCFA.....	57
4.2.4	Ergebnisse der Bestimmung von D- und L-Laktat.....	58
4.2.5	Ergebnisse der Bestimmung von biogenen Aminen.....	58

---

4.2.6	Ergebnisse der Bestimmung von Phenol- und Indolverbindungen.....	59
<b>4.3</b>	<b>Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota .....</b>	<b>67</b>
4.3.1	Ergebnisse der Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota der Kotproben .....	67
4.3.2	Ergebnisse der Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota des Fermentationszentrifugats .....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
<b>5.1</b>	<b>Diskussion der Versuchsbedingungen und des Studiendesigns.....</b>	<b>72</b>
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
5.2.1	Einfluss des Proteingehalts der Diät auf das Stoffwechsellpotential der Mikrobiota .....	74
5.2.2	Einfluss von Inulin auf das Stoffwechsellpotential der Mikrobiota .....	76
5.2.3	Einfluss von <i>Yucca schidigera</i> auf das Stoffwechsellpotential der Mikrobiota...80	
5.2.4	Einfluss von Inulin in Kombination mit <i>Yucca schidigera</i> auf das Stoffwechsellpotential der Mikrobiota .....	81
5.2.5	Einfluss des Proteingehalts der Diät auf die Zusammensetzung der Mikrobiota 82	
5.2.6	Einfluss von Inulin auf die Zusammensetzung der Mikrobiota .....	85
5.2.7	Einfluss von <i>Yucca schidigera</i> auf die Zusammensetzung der Mikrobiota .....	87
5.2.8	Einfluss von Inulin in Kombination mit <i>Yucca schidigera</i> auf die Zusammensetzung der Mikrobiota .....	88
<b>5.3</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>126</b>
<b>12</b>	<b>Finanzierungsquellen .....</b>	<b>127</b>
<b>13</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>128</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

® eingetragenes Warenzeichen

ALT Alanin-Aminotransferase

BARF “Bones And Raw Foods” oder “Biologisch Artgerechte Rohfütterung”

BCFA verzweigt-kettige Fettsäuren (branched chain fatty acids)

bp Basenpaar

Ca Kalzium

DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DP Polymerisationsgrad (degree of polymerization)

EN Europäische Norm

Fe Eisen

FOS Fruktooligosaccharide

h Stunde (hour)

I Inulin

KBE Koloniebildende Einheiten

log Logarithmus zur Basis 10

MHC Mittleres korpuskuläres Hämoglobin

MHK Minimale Hemmkonzentration

mmol Millimol

Ø Durchschnittswert

oS organische Substanz

PCR Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

pH negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwerts der H<sup>+</sup>-Aktivität

PRAS Prereduced Anaerobe Sterilized

qPCR Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction)

Ra Rohasche

Rfe Rohfett

Rp Rohprotein (N x 6,25)

SCFA kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)

spp. Spezies (Arten)

sV scheinbare Verdaulichkeit

TS Trockensubstanz

uS ursprüngliche Substanz

VDLUFA Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

vs. gegenüber (versus)

YSP *Yucca schidigera* Pulver

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Luminale Metaboliten, die aus Aminosäurevorläufern im Dickdarm durch Fermentation gebildet werden können (Blachier <i>et al.</i> 2007) .....	13
Tabelle 2: Übersicht ausgewählter Metaboliten des Proteinstoffwechsels beim Hund ( <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Fermentation).....	14
Tabelle 3: Untersuchungen zur Wirkung von <i>Yucca schidigera</i> beim Hund ( <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Fermentation).....	23
Tabelle 4: Untersuchungen zur Wirkung von Inulin beim Hund ( <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Fermentation).....	28
Tabelle 5: Übersicht zu <i>in vitro</i> Fermentationsstudien mit fäkalem Inokulum vom Hund .....	33
Tabelle 6: Verwendete Primer für die qPCR .....	52
Tabelle 7: Reaktionslösungen für die qPCR .....	53
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der qPCR.....	53
Tabelle 9: Mittlere Gehalte von SCFA im Fermentationsüberstand nach 24 h <i>in vitro</i> Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> , 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden .....	60
Tabelle 10: Mittlere molare Verhältnisse von SCFA im Fermentationsüberstand nach 24 h <i>in vitro</i> Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> , 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden.....	61
Tabelle 11: Mittlere Gehalte von SCFA sowie deren molare Verhältnisse im Fermentationsüberstand nach 24 h <i>in vitro</i> Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> , 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin; zusammengefasst als arithmetisches Mittel der Messwerte von Diät A und B (n = 10).....	62
Tabelle 12: Mittlerer pH-Wert, Gehalt von Ammonium und der Quotient aus Ammonium und Gesamtkonzentration SCFA im Fermentationsüberstand nach 24 h <i>in vitro</i> Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> , 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden .....	63

Tabelle 13: Mittlerer pH-Wert, Gehalt von Ammonium und der Quotient aus Ammonium und Gesamtkonzentration SCFA im Fermentationsüberstand nach 24 h <i>in vitro</i> Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> , 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin; zusammengefasst als arithmetisches Mittel der Messwerte von Diät A und B (n = 10).....	64
Tabelle 14: Mittlere Gehalte bakterieller Metaboliten im Fermentationsüberstand nach 24 h <i>in vitro</i> Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> , 5,00 g/l Inulin und der Kombination aus 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> mit 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden .....	65
Tabelle 15: Mittlere Gehalte bakterieller Metaboliten im Fermentationsüberstand nach 24 h <i>in vitro</i> Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> , 5,00 g/l Inulin und der Kombination aus 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> mit 5,00 g/l Inulin; zusammengefasst als arithmetisches Mittel der Messwerte von Diät A und B (n = 10).....	66
Tabelle 16: Mittlere Gehalte an Bakterien (dargestellt als log 16S rDNA Kopien/ ml) sowie die relativen Verhältnisse einzelner Bakterien im Cluster im Fermentationszentrifugat nach 24 h <i>in vitro</i> Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> , 5,00 g/l Inulin und der Kombination aus 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> mit 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden .....	69
Tabelle 17: Mittlere Gehalte an Bakterien (dargestellt als log 16S rDNA Kopien/ ml) sowie die relativen Verhältnisse einzelner Bakterien im Cluster im Fermentationszentrifugat nach 24 h <i>in vitro</i> Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> , 5,00 g/l Inulin und der Kombination aus 4,00 g/l <i>Yucca schidigera</i> mit 5,00 g/l Inulin; zusammengefasst als arithmetisches Mittel der Messwerte von Diät A und B (n = 10).....	71
Tabelle 18: Zusammensetzung der Versuchstierpopulation .....	113
Tabelle 19: Geräte und Chemikalien für die <i>in vitro</i> Fermentation .....	113
Tabelle 20: Geräte und Chemikalien für die pH-Messung.....	115
Tabelle 21: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von Ammonium.....	115
Tabelle 22: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von kurzkettigen und verzweigtkettigen Fettsäuren.....	116
Tabelle 23: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von D- und L-Laktat .....	117
Tabelle 24: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von biogenen Aminen .....	118
Tabelle 25: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von Phenol- und Indolverbindungen .....	119
Tabelle 26: Geräte und Chemikalien für die DNA-Extraktion .....	120
Tabelle 27: Geräte und Chemikalien für die dsDNA-Konzentrationsbestimmung.....	121

Tabelle 28: Geräte und Chemikalien für die qPCR .....	122
Tabelle 29: Zusammensetzung, Rohnährstoffgehalte und metabolisierbare Energie der Versuchsdieten mit einem niedrigen Rohproteingehalt (Diät A) und hohem Rohproteingehalt (Diät B).....	123
Tabelle 30: Rohnährstoffgehalte in Kotproben von Hunden, die mit einem niedrigen Rohproteingehalt (Diät A) und einem hohem Rohproteingehalt (Diät B) gefüttert wurden....	123
Tabelle 31: Relative Häufigkeit der dominierenden bakteriellen 16S rRNA-Sequenzen (dargestellt in Prozent der Gesamtsequenzen) in Kotproben von Hunden, die mit einem niedrigen Rohproteingehalt (Diät A) und einem hohem Rohproteingehalt (Diät B) gefüttert wurden .....	124

## 1 Einleitung

Futtermittel mit einem hohen Gehalt an Protein, insbesondere in Form von tierischen Proteinquellen, sind ein wachsender Trend in der Ernährung von Hunden. Diese Entwicklung ist insbesondere bei „alternativen“ Fütterungsformen wie dem BARFen und dem „Preyen“ (Fütterung von ganzen Beutetieren) zu beobachten.

Bei einer vermehrten Aufnahme von Protein oder auch bei geringer präzäkaler Verdaulichkeit kann die Verdauungs- und Absorptionskapazität des Dünndarms überschritten werden, sodass es zu einer gesteigerten Anflutung von präzäkal unverdaulichem Protein im Dickdarm kommt (Hussein und Sunvold 2000). Dies kann zu einer Zunahme mikrobieller Fermentationsprodukte wie Ammoniak, Amine, Phenole und Indole führen, die eine nachteilige Wirkung auf den Organismus haben können. In diesem Zusammenhang wird bei Hunden großer Rassen die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Verdauungsstörungen in Verbindung mit einer im größeren Ausmaß ablaufenden Proteinfermentation gesehen, die in höheren Konzentrationen an Ammoniak und anderen Proteinfermentationsprodukten (z.B. Valeriansäure, Phenole, Indol) resultiert (Nery *et al.* 2012). Für Histamin wird beim Hund eine Bedeutung für das Auftreten von alimentär bedingten Verdauungsstörungen angenommen (Pietrzak *et al.* 2002). Zudem können bei proteinreich gefütterten Hunden Veränderungen in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota beobachtet werden, die auf Ebene der Spezies insbesondere durch einen Anstieg von *Clostridium perfringens* gekennzeichnet sind (Zentek *et al.* 2003, Li *et al.* 2017).

Bei Nutz- und Haustieren werden *Yucca schidigera* Produkte als diätetischer Zusatz zur Reduktion des Geruchs und Gehalts an Ammoniak der Exkremente eingesetzt (Cheeke 2000), wobei der Wirkmechanismus bis heute nicht bekannt ist (Piacente *et al.* 2005). Zu Inulin ist bei Monogastriern ein „bifidogener Effekt“ im Dickdarm bekannt (Gibson und Roberfroid 1995). In Futtermitteln für Hunde und Katzen wird es zugesetzt zur Manipulation der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota, Stimulation der Darmintegrität, Beeinflussung des Stickstoffmetabolismus und Reduktion von abstoßendem Fäkalgeruch (Hussein *et al.* 1999, Flickinger *et al.* 2003a). Beide Komponenten stellen eine Möglichkeit dar, die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität sowie die daraus resultierenden Metaboliten, vor allem der Proteinfermentation, der caninen Mikrobiota zu beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit wurde aus dem wissenschaftlichen Interesse durchgeführt, die Möglichkeiten zur Manipulation der bakteriellen Proteinfermentation im unteren Verdauungstrakt von Hunden durch den gezielten Zusatz von *Yucca schidigera* allein und in Kombination mit Inulin zu erforschen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Zusammensetzung und Einflussfaktoren der Mikrobiota des caninen Verdauungstraktes

#### 2.1.1 Zusammensetzung der Mikrobiota des caninen Verdauungstraktes

Die Hauptfunktionen der intestinalen Mikrobiota sind metabolische Aktivitäten, die in einer Energiegewinnung und absorbierbaren Nährstoffen resultieren, trophische Effekte auf das intestinale Epithel sowie auf die Struktur und Funktion des Immunsystems haben, und der Schutz des Wirtsorganismus gegen fremdartige Mikroben (Guarner und Malagelada 2003). Die schützende Rolle der Darmmikrobiota für den Wirt beruht insbesondere auf einem Wettbewerb um Nährstoffe sowie Adhäsionsstellen, der Produktion von antimikrobiellen Substanzen zur Abwehr von Pathogenen und der Modulation der Immunabwehrmechanismen des Wirts gegen Krankheitserreger (Darkoh *et al.* 2019).

Der Hund als Karnivor mit einem relativ einfach aufgebauten Gastrointestinaltrakt stützt, im Vergleich zum Mensch und anderen Tieren, seine Energiebalance nicht auf die bakterielle Fermentation der Mikrobiota. Als dominierende Stämme im Darmtrakt vom Hund wurden die Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* und *Actinobacteria* identifiziert (Deng und Swanson 2015).

Im Magen von gesunden Hunden ist die Gesamtkeimzahl vergleichsweise gering mit 5,00 log 16S rRNA Kopieanzahlen/g. Aktuelle Untersuchungen, die mit einer PCR und 16S rRNA Genbibliotheken durchgeführt wurden, haben in der Mehrzahl als bakterielle Phyla *Proteobacteria* (99,6 % der gewonnenen Gensequenzen) mit *Helicobacter* spp. (98,6 %) als dominierende Spezies und nur wenige *Firmicutes* (0,30 %) nachgewiesen (Garcia-Mazcorro *et al.* 2012).

Im Dünndarm nimmt die Keimzahl vom Duodenum bis zum Ileum des Hundes zu, wobei die oberen Abschnitte physiologisch weniger besiedelt sind. Dies beruht auf der hohen Peristaltik, der antibakteriellen Wirkung von Magen- und Gallensäuren sowie dem niedrigen intestinalen pH-Wert (Amtsberg *et al.* 1980, Zentek 2000). Im Verlauf des Dünndarms vom Hund nimmt der Anteil anaerober gegenüber den aeroben Mikroorganismen zu, wobei am Ende des Dünndarms nahezu ein Gleichgewicht vorliegt (Zentek 2000). Die Gesamtkeimzahl im Duodenum liegt bei 5,20 log 16S rRNA Kopieanzahlen/g (Garcia-Mazcorro *et al.* 2012). Im Duodenum gesunder Hunde wurden folgende bakterielle Phyla identifiziert:

*Firmicutes* 46,4 % (Xenoulis *et al.* 2008), 46,9 % (Garcia-Mazcorro *et al.* 2012), 26,1 % (Suchodolski *et al.* 2010), *Proteobacteria* 26,6 % (Xenoulis *et al.* 2008), 21,2 % (Garcia-Mazcorro *et al.* 2012), 52,9 % (Suchodolski *et al.* 2010), *Bacteroidetes* 11,2 % (Xenoulis *et al.* 2008), 6,90 % (Garcia-Mazcorro *et al.* 2012), 7,70 % (Suchodolski *et al.* 2010), *Spirochaetes* 10,3 % (Xenoulis *et al.* 2008), *Fusobacteria* 3,60 % (Xenoulis *et al.* 2008), 0,20 % (Garcia-Mazcorro *et al.* 2012), 4,40 % (Suchodolski *et al.* 2010), *Actinobacteria* 1,00 % (Xenoulis *et al.* 2008), 1,40 % (Garcia-Mazcorro *et al.* 2012), 8,60 % (Suchodolski *et al.* 2010), *Tenericutes* 0,20 % (Suchodolski *et al.* 2010), *Verrucomicrobia* 0,10 % (Suchodolski *et al.* 2010). Dabei zählt knapp die Hälfte aller analysierten Sequenzen (47,6 %) zu den Ordnungen *Clostridiales* (19,6 %), *Lactobacillales* (14,1 %) und *Campylobacteriales* (13,9 %). Die Mehrheit der Sequenzen in diesen Ordnungen gehört zu den Familien *Clostridiaceae* (70,7 %), *Carnobacteriaceae* (52,5 %) und *Helicobacteriaceae* (94,8 %) (Xenoulis *et al.* 2008). Im Jejunum gesunder Hunde wurden die nachfolgenden bakteriellen Phyla gefunden: *Proteobacteria* 46,7 %, *Firmicutes* 15,0 %, *Actinobacteria* 11,2 %, *Spirochaetes* 14,2 %, *Bacteroidetes* 6,20 %, *Fusobacteria* 5,40 %, *Tenericutes* < 0,10 %, *Verrucomicrobia* < 0,10 %, *Cyanobacteria* < 0,10 % und *Chloroflexi* < 0,10 % (Suchodolski *et al.* 2009). Im Ileum dominieren die Phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, mit den Ordnungen *Fusobacteriales* (32,6 %), *Clostridiales* (25,0 %), *Bacteroidales* und *Enterobacteriales* (Suchodolski *et al.* 2008).

Der Dickdarm ist insgesamt stärker mikrobiell besiedelt als die weiter oral gelegenen Abschnitte des Gastrointestinaltrakts aufgrund der im Vergleich zum Dünndarm verminderten Peristaltik, der ausgeprägt anaeroben Bedingungen und der geringeren Einwirkung durch die Verdauungssekrete. Dabei ist das Keimspektrum durch eine Zunahme anaerober Mikroorganismen gekennzeichnet, die gegenüber den Aerobiern dominieren (Zentek 2000). Im Kolon gesunder Hunde dominieren die Phyla *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* und nur im geringen Anteil *Proteobacteria* (1,40 %), mit den Ordnungen *Fusobacteriales* (28,9 %), *Bacteroidales*, *Clostridiales* (26,0 %) und *Lactobacillales* (Suchodolski *et al.* 2008). Darüber hinaus konnte für den Dickdarm im Vergleich zum Magen und Dünndarm ein altersbedingter Unterschied in der Zusammensetzung der Mikrobiota festgestellt werden. Hunde mit einem Alter von über elf Jahren zeigten gegenüber Tieren in einem Alter von unter einem Jahr reduzierte Gehalte an Bifidobakterien, Laktobazillen, *Bacteroides* spp., Eubakterien, Peptostreptokokken und Staphylokokken. Ein vermehrtes Vorkommen von *Clostridium perfringens* und Streptokokken wurden bei den älteren Tieren im Dickdarm festgestellt (Benno *et al.* 1992a).

Die Gesamtkeimzahl im Fäzes liegt zwischen 6,00 und 6,50 log 16S rRNA Kopieanzahlen/g (Garcia-Mazcorro *et al.* 2012). Als dominierende bakterielle Phyla wurden im Fäzes gesunder Hunde gefunden: *Firmicutes* 15,0- 28,0 % (Middelbos *et al.* 2010), 95,4 ± 5,19 % (Handl *et al.* 2011), *Bacteroidetes* 32,0- 34,0 % (Middelbos *et al.* 2010), 2,25 ± 5,37 % (Handl *et al.* 2011), *Proteobacteria* 5,00- 6,00 % (Middelbos *et al.* 2010), *Actinobacteria* 1,40- 0,80 % (Middelbos *et al.* 2010), 1,80 ± 1,32 % (Handl *et al.* 2011), *Fusobacteria* 40,0- 24,0 % (Middelbos *et al.* 2010), 0,30 ± 0,43 % (Handl *et al.* 2011). Innerhalb der *Firmicutes* gehörten 69,4 ± 18,5 % aller analysierten Sequenzen zu der Klasse *Clostridia*, die wiederum durch die Genera *Clostridium* (22,7 ± 15,5 %) und *Ruminococcus* (17,4 ± 11,2 %) dominiert wurden. Die Klasse *Bacilli* (17,1 ± 26,1 %) mit der Ordnung *Lactobacillales*, in der die Genera *Streptococcus* und *Lactobacillus* dominierten, war neben der Klasse *Clostridia* vorherrschend (Handl *et al.* 2011). Zudem konnte auch im Fäzes ein altersassoziiertes Unterscheid in der Zusammensetzung festgestellt werden. Hunde mit einem Alter von 10,9 ± 0,70 Jahren zeigten einen reduzierten Gehalt an *Bacteroides* spp. (9,88 log KBE) im Vergleich zu 2,50 ± 0,50 Jahre alten Tieren (10,2 log KBE/g Fäzes). Darüber hinaus ließen die Ergebnisse dieser Untersuchung die Schlussfolgerung zu, dass jedes Individuum eine charakteristische fäkale Mikrobiota beherbergt (Simpson *et al.* 2002). Eine weitere Untersuchung bestätigte die interindividuellen Schwankungen in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota, auch unter identischen Haltungs- und Fütterungsbedingungen, sowie eine leichte saisonale Variation der Keimzahlen (Benno *et al.* 1992b).

### 2.1.2 Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung der Mikrobiota des caninen Verdauungstraktes

Ein wesentlicher Einflussfaktor auf die Zusammensetzung der Mikrobiota ist die Fütterung. Dabei lassen sich die nutritiven Einflüsse grob unterteilen in die orale Aufnahme von Bakterien, die Haftungsvermittlung zwischen Bakterien und Darmwand sowie die Zufuhr von Nähr- und Wirkstoffen (Zentek 2000).

Die orale Aufnahme von Bakterien kann unterschieden werden in die gezielte Aufnahme von Bakterien, die mit möglichen positiven gesundheitlichen Wirkungen assoziiert werden (Probiotika) sowie die ungewollte Aufnahme von Futtermittelkontaminanten und Koprophagie. In Untersuchungen bei denen *Enterococcus*-Stämme als Probiotikum beim Hund eingesetzt wurden, konnten erhöhte Mengen an *Enterococcus* im Fäzes (Molitor 1996, Weiß 2003, Marciňáková *et al.* 2006, Mück 2007) und Chymus identifiziert werden (Molitor

---

1996, Zentek *et al.* 1998a), was für die Dauer der Supplementierung auf eine zeitweise Besiedlung des Intestinaltrakts schließen lässt. Des Weiteren konnten auch als Probiotikum eingesetzte Laktobazillen und *Bacillus cereus* im Fäzes von Hunden nachgewiesen werden (Biourge *et al.* 1998, Baillon *et al.* 2004, Stropfová *et al.* 2006). In einer *in vitro* Untersuchung mit caninem Darmschleim konnte durch den Zusatz von verschiedenen Laktobazillen eine Reduktion der Adhäsion von *Clostridium perfringens* zwischen 53,7 und 79,1 % festgestellt werden (Rinkinen *et al.* 2003). Die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Ansiedelung der Bakterien nur temporär ist, da sie kurz nach Beendigung der Applikation nicht mehr nachweisbar waren (Biourge *et al.* 1998, Zentek *et al.* 1998a, Weese und Anderson 2002). In einer Studie zur Fütterung von Hunden mit Diäten aus rohem Fleisch (BARF Rationen) konnte gezeigt werden, dass in 15,0 % der untersuchten kommerziellen BARF Rationen *Campylobacter* als Futtermittelkontaminant enthalten war. Ein eindeutiger signifikanter Unterschied in der fäkalen Ausscheidung von *Campylobacter* bei Hunden, die mit BARF Rationen gefüttert wurden, im Vergleich zu Hunden, die Trockenfutter erhalten haben, konnte nicht festgestellt werden (Fredriksson-Ahomaa *et al.* 2017).

In mehreren Untersuchungen zur Haftungsvermittlung von Futtermittelbestandteilen zwischen Bakterien und Darmwand konnten glykoproteininhaltige Lektine als Ursache bei verschiedenen Tieren identifiziert werden (Untawale *et al.* 1978, Banwell *et al.* 1983, Banwell *et al.* 1985). Untersuchungen zur Überprüfung der Relevanz beim Hund gibt es nicht.

Als wesentliche Faktoren zum Einfluss auf die Mikrobiota, durch die Zufuhr von Nähr- und Wirkstoffen, sind der Protein- sowie Kohlenhydratgehalt der aufgenommenen Nahrung, die Applikation von Präbiotika und die Form der Fütterung zu nennen.

Bei der Betrachtung des Einflusses durch die Zufuhr von Nähr- und Wirkstoffen haben der Gehalt an Protein, dessen Verdaulichkeit und Konzentration, sowie die Art der Kohlenhydrate, als mengenmäßig dominierende Nährstoffe der täglichen Ration, die Hauptwirkung. In einer Untersuchung, in der Diäten einem mit hohem Protein- und geringem Kohlenhydratgehalt ((HPLC) 494 g/kg Protein, 109 g/kg Kohlenhydrate) sowie geringem Protein- und hohem Kohlenhydratgehalt ((LPHC) 255 g/kg Protein, 388 g/kg Kohlenhydrate) an Hunde gefüttert wurden, konnten folgende Veränderungen der dominierenden bakteriellen Phyla identifiziert werden: *Firmicutes* 50,1 % (HPLC) 34,3 % (LPHC), *Proteobacteria* 3,94 % (HPLC) 6,51 % (LPHC), *Bacteroidetes* 28,0 % (HPLC) 36,7 % (LPHC), *Fusobacteria* 17,3 % (HPLC) 21,7 % (LPHC). Auf Ebene der Spezies konnte nach der Gabe der proteinreichen Diät eine vermehrte Präsenz von *Clostridium perfringens* 0,62 % (HPLC) 0,01 % (LPHC), *Clostridium hiranonis* 12,3 % (HPLC) 5,33 % (LPHC) und

*Ruminococcus gnavus* 1,95 % (HPLC) 0,63 % (LPHC) beobachtet werden. Bei der kohlenhydratreichen Diät wurde ein Anstieg bei *Bacteroides uniformis* 0,01 % (HPLC) 0,14 % (LPHC) und *Clostridium butyricum* 0,00 % (HPLC) 0,01 % (LPHC) nachgewiesen (Li *et al.* 2017). Bereits eine ältere Studie mit kulturellem Bakteriennachweis konnte einen Anstieg von *Clostridium perfringens* nach einer proteinreichen Fütterung im Fäzes nachweisen (8,20- 8,80 log KBE/g (726 g/kg TS Rp); 3,30- 4,00 KBE/g (259 g/kg TS Rp)), wobei der vermehrte Gehalt bereits nach einem Tag sichtbar war (Zentek *et al.* 2003). Zudem besteht eine Verbindung zwischen der Aufnahme von tierischem Protein und einem vermehrten Nachweis von *Clostridium perfringens* im Ileumchymus (8,70 ± 0,30 log KBE/g (Grießenmehl); 7,00 ± 0,80 KBE/g (Maiskleber-Mischung)) (Zentek 1995b).

In zahlreichen Untersuchungen wurde die Wirkung von verschiedenen mikrobiell fermentierbaren Kohlenhydraten (Präbiotika) auf die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota beim Hund betrachtet. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen überwiegend nur eine schwache Stimulation des Wachstums von Bifidobakterien und Laktobazillen sowie eine Reduktion von *Clostridium perfringens* (Beynen *et al.* 2002, Grieshop *et al.* 2002, Flickinger *et al.* 2003a, Zentek *et al.* 2003, Middelbos *et al.* 2007, Beloshapka *et al.* 2013).

In Bezug auf den Einfluss von Fütterung und Nahrungskarenz auf die Mikrobiota des Dünndarms beim Hund konnte festgestellt werden, dass fünf Stunden postprandial (pp) im Vergleich zu 15 Minuten vor der Fütterung (pf) die Zusammensetzung der Mikrobiota größtenteils unverändert ist. Lediglich der Gehalt an *Betaproteobacteria* 5,80 % (pf) 0,20 % (pp) und *Bacteroidales* 2,50 % (pf) 0,40 % (pp) war reduziert. Eine Nahrungskarenz für vier Tage (nk) resultierte in einer deutlichen Veränderung der jejunalen Mikrobiota im Vergleich zur regulären Fütterung (rf). Folgende Veränderungen der dominierenden bakteriellen Phyla wurden identifiziert: *Firmicutes* 6,80 % (nk) 76,8 % (rf), *Proteobacteria* 6,10 % (nk) 1,30 % (rf), *Bacteroidetes* 12,8 % (nk) 1,10 % (rf), *Fusobacteria* 67,6 % (nk) 14,1 % (rf), *Actinobacteria* 0,10 % (nk + rf) (Kasiraj *et al.* 2016). Zudem konnte in einer Untersuchung, in der Hunde ad libitum oder rationiert gefüttert wurden, ein signifikanter Anstieg der Ordnung *Clostridiales* bei ad libitum Fütterung festgestellt werden (Handl *et al.* 2013).

Nicht nutritive Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung der Mikrobiota beim Hund sind das Lebensalter, die Rasse sowie die Körpergröße.

Wie bereits im vorangestellten Kapitel erläutert, wurden beim Hund altersassoziierte Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota im Dickdarm (Benno *et al.* 1992a) und Fäzes (Simpson *et al.* 2002) festgestellt. Diese Veränderungen wurden durch die Autoren als Folge mehrerer Faktoren, die mit dem Alter in Zusammenhang stehen, erklärt.

---

Dazu wurden eine altersbedingt herabgesetzte Motilität des Darms, verminderte Sekretionsvorgänge und Funktionsverluste des Immunsystems genannt (Benno *et al.* 1992a).

In Untersuchungen mit Hunden unterschiedlicher Körpergrößen und Rassen konnte festgestellt werden, dass Hunde kleiner Rassen (Toy-Pudel, Jack Russel, Zwergschnauzer) einen höheren Gehalt an *Clostridium perfringens*  $5,90 \pm 0,30$  log KBE/g Fäzes (Nery *et al.* 2012) bzw. Clostridien mit  $6,82$  log KBE/g Fäzes (Simpson *et al.* 2002) mit dem Kot ausscheiden. Hunde großer Rassen (Riesenschnauzer, Englischer Setter) wiesen eine Konzentration von *Clostridium perfringens* in Höhe von  $3,80 \pm 0,30$  log KBE/g Fäzes (Nery *et al.* 2012) bzw. Clostridien  $6,75$  log KBE/g Fäzes (Simpson *et al.* 2002) auf. Zudem konnte beobachtet werden, dass Hunde großer, verdauungssensibler Rassen (Deutscher Schäferhund), die zu einer schlechteren Kotkonsistenz neigen, im Vergleich zu Hunden großer Rassen (Riesenschnauzer, Englischer Setter), eine höhere Menge an *Clostridium perfringens*  $4,70 \pm 0,30$  log KBE/g Fäzes (Nery *et al.* 2012) bzw. Clostridien mit  $7,32$  log KBE/g Fäzes ausscheiden (Simpson *et al.* 2002). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sowohl die Körpergröße, als auch die Rasse als relevante Faktoren anzusehen sind.

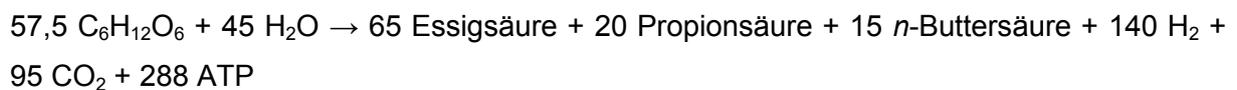
Ein Einfluss der Körpermasse auf die Mikrobiota, wie er bei Menschen und Mäusen bereits identifiziert wurde, konnte in einer Untersuchung mit schlanken und übergewichtigen Hunden nicht bestätigt werden. Jedoch weisen die Autoren darauf hin, dass die Hundepopulation der Studie klein war und durch andere Einflussfaktoren wie Alter, Rasse, Diät oder Haltungsform eventuell die Effekte von Obesitas maskiert wurden (Handl *et al.* 2013). In einer weiteren Untersuchung mit 16 schlanken Hunden ((LN) Körperfettgehalt 24,8 bis 20,4 %) und 16 übergewichtigen Hunden ((OW) Körperfettgehalt 41,4 bis 39,5 %) konnten folgende Veränderungen der dominierenden bakteriellen Phyla identifiziert werden: *Firmicutes* 30,4 % (LN) 35,3 % (OW), *Proteobacteria* 6,72 % (LN) 5,63 % (OW), *Bacteroidetes* 43,9 % (LN) 38,1 % (OW) und *Fusobacteria* 18,5 % (LN) 20,4 % (OW) (Li *et al.* 2017).

Die Effekte, die bei Gesundheitsstörungen durch die Besiedlung des Gastrointestinaltrakts mit spezifischen pathogenen Keimen sowie bei einer Entgleisung der Beziehung zwischen der intestinalen Mikrobiota und dem Wirtsorganismus, resultierend in einer Dysbiose, auftreten, werden im Weiteren nicht erläutert, da sie nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

## 2.2 Stoffwechsel von Makronährstoffen durch die canine intestinale Mikrobiota

### 2.2.1 Bakterielle Fermentation von Kohlenhydraten

Die große Mehrheit der Bakterien im Kolon ist strikt anaerob und gewinnt dementsprechend ihre Energie durch Fermentation. Die Hauptsubstrate der Fermentation sind Kohlenhydrate, wie resistente Stärke, resistente Dextrine, Nicht-Stärke Polysaccharide (wie Pektine, Arabinogalactane, Gummi arabicum, Guarkernmehl, Hemizellulose), nicht-verdauliche Oligosaccharide pflanzlichen Ursprungs (wie Raffinose, Stachyose, Galactane, Mannane), unverdaute Disaccharide (wie Laktose) und Zuckeralkohole (wie Lactitol, Isomalt), neben unverdaulichem Protein aus dem Dünndarm (Roberfroid *et al.* 2010). Zudem stellen desquamierte Zellen des Gastrointestinaltrakts, Mukus und endogene Sekrete eine Quelle für fermentierbare Polysaccharide dar. Verdauliche Kohlenhydrate, wie Glukose und Stärke, werden auch fermentiert, wenn sie im Dünndarm, aufgrund einer übermäßigen Aufnahme oder Malabsorption, nicht verdaut oder absorbiert wurden (Bergman 1990). Die anaerobe Fermentation von Kohlenhydraten im Kolon kann durch die nachfolgende allgemeine Gleichung zusammengefasst werden (Soergel 1994):



Die im Rahmen der Fermentation gebildeten kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) entsprechen etwa 75,0 % des ursprünglichen Energiehalts der Kohlenhydrate. Die restlichen 25,0 % werden von den Bakterien zum Wachstum genutzt oder gehen in Form von Wasserstoff und Methan verloren. Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure sind die SCFA, die überwiegend als Endprodukte der Fermentation anfallen. Weitere Metaboliten der Kohlenhydratfermentation sind Laktat, Pyruvat, Ethanol, Succinat sowie die Gase Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und Methan (Bergman 1990, Roberfroid *et al.* 2010). Das Verhältnis der gebildeten Endprodukte variiert in Abhängigkeit der verfügbaren Substrate und der Dickdarmpassagezeit. Die vorwiegenden saccharolytischen Spezies der Mikrobiota des Kolons gehören zu den Genera *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* und *Clostridium* (Roberfroid *et al.* 2010). Der überwiegende Anteil, der mit dem Chymus in den Dickdarm eintretenden Kohlenhydrate, wird im proximalen Kolon fermentiert. Im Verlauf zum distalen Kolon nimmt die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten ab und Proteine sowie Aminosäuren erlangen eine zunehmende Bedeutung als Energiequelle für die Mikrobiota (Macfarlane *et al.* 1992b).

## 2.2.2 Bakterielle Fermentation von Protein

Der aktuelle wissenschaftliche Konsens ist, dass eine gewisse Aufnahme von Aminosäuren im Dickdarm auftreten kann, diese aber nicht wesentlich zur Versorgung des Hundes mit Aminosäuren beiträgt (Hendriks *et al.* 2012). Eine Analyse von 30 Studien mit Hunden zeigte im Durchschnitt eine Differenz zwischen der ilealen und fäkalen scheinbaren Verdaulichkeit des Nahrungsstickstoffs von  $9,40 \% \pm 6,00$ . Diese Daten deuten auf einen signifikanten mikrobiellen Stoffwechsel von unverdaulichem und endogenem Stickstoff sowie auf die Produktion und Absorption von Ammoniak und anderen katabolen Produkten im Dickdarm von Hunden hin (Hendriks *et al.* 2012). Zu den im Gastrointestinaltrakt dominierenden Bakterien, die Aminosäuren fermentieren, zählen Vertreter von *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* und *Proteobacteria*. Auf Ebene der Spezies kommen bei proteinreich gefütterten Hunden *Clostridium perfringens*, *Clostridium hiranonis* und *Ruminococcus gnavus* vermehrt vor (Li *et al.* 2017).

Die bakterielle Fermentation von Protein beginnt mit der Hydrolyse der Polypeptide durch Proteasen und Peptidasen zu kleineren Peptiden und Aminosäuren. Dadurch freigesetzte Aminosäuren, oder zuvor bereits vorhandene, werden durch Desaminierung, Decarboxylierung sowie Alpha- und Beta-Elimination abgebaut. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der luminalen Metaboliten, die aus Aminosäuren im Dickdarm gebildet werden können. Der Gehalt an Produkten der Proteinfermentation, wie Ammoniak, verzweigtkettigen Fettsäuren (BCFA) und Phenolverbindungen, nimmt beim Menschen im Dickdarm progressiv vom rechten zum linken Kolon zu (Macfarlane *et al.* 1992b).

*In vitro* Untersuchungen zur bakteriellen Proteinfermentation durch die fäkale Mikrobiota beim Menschen haben gezeigt, dass, neben den flüchtigen Fettsäuren, Ammoniak zu den Hauptmetaboliten zählt (Macfarlane und Allison 1986). Dabei wird Ammoniak bzw. Ammonium im Darmtrakt durch die Desaminierung von Aminosäuren gebildet sowie in geringeren Mengen durch ureasebildende Bakterien über die Hydrolyse von Harnstoff, der in den Darm ausgeschiedenen wurde (Blachier *et al.* 2007). Die Konzentration von Ammoniak im Lumen des distalen Kolons liegt bei der Ratte zwischen 39,0 und 74,0 mmol/l (Lin und Visek 1991). Der überwiegende Anteil an Ammoniak wird über den Kot oder nach Absorption aus dem Darm über den Urin eliminiert. Zudem fungiert es als Stickstoffquelle für die Mikrobiota zur Proteinsynthese (Ma *et al.* 2017). Beim Hund variiert der Ammoniakgehalt im Kot in Abhängigkeit der Konzentration sowie Verdaulichkeit des aufgenommenen Proteins und der Körpermasse zwischen 0,70 bis 2,10 mg/g TS. Die höchste fäkale Ammoniakkonzentration wurde in einer Untersuchung nach der Gabe eines Futters mit

einem Rohproteingehalt von 392 g/kg TS und Geflügelmehl als Hauptproteinquelle an große, verdauungssensible Hunde (Deutscher Schäferhund), die zu einer weniger geformten Kotkonsistenz mit einer höheren Feuchte neigen, festgestellt (Nery *et al.* 2012). Ammoniak ist durch verschiedene Untersuchungen als Toxin bekannt. Es hemmt den oxidativen Stoffwechsel von SCFA in Kolonzellen. In einem *in vitro* Versuch mit Kolonzellen vom Schwein wurde durch den Zusatz von Ammoniak (10,0 mmol/l NH<sub>4</sub>Cl) der Stoffwechsel von Buttersäure um 30,0 % reduziert und gleichzeitig der von Glukose um 20,0 % erhöht (Darcy-Vrillon *et al.* 1996). Bei einer *in vitro* Untersuchung mit Kolonzellen von Ratten und dem Zusatz von 40,0 mmol/l NH<sub>4</sub>Cl lassen die Ergebnisse die Vermutung zu, dass *in vivo* der Metabolismus von SCFA nur beeinträchtigt wird, wenn die Verfügbarkeit von Glukose eingeschränkt ist (Cremin *et al.* 2003). Beim Menschen sind höhere Ammoniakkonzentrationen im distalen Kolon assoziiert mit einer Tumorpromotion (Hughes *et al.* 2000). Eine Untersuchung mit Ratten, denen eine intrarektale Infusion für zwei Wochen mit 24,8 mg Ammoniak sowie 2,00 mg Cholsäure einzeln oder in Kombination appliziert wurde, zeigte einen Anstieg des Vorkommens von Adenokarzinomen bei der Gruppe mit der Ammoniakbehandlung (Clinton *et al.* 1988). Zudem konnte in einem humanen Caco-2 (Caucasian colon adenocarcinoma) Zellmodell festgestellt werden, dass Ammoniak sowie Phenole und sekundäre Gallensäuren bei Dosierungen, die typischerweise im Fäzes von Menschen gefunden werden, die parazelluläre Permeabilität steigern und die Epithelbarrierefunktion reduzieren. Die Autoren schlussfolgerten aus den Ergebnissen, dass diese, von der Mikrobiota, gebildeten Metaboliten tumorpromotiv wirken (Hughes *et al.* 2008).

Darüber hinaus haben *in vitro* Untersuchungen mit fäkalem Inokulum vom Mensch gezeigt, dass kurzkettige Fettsäuren (SCFA) die Hauptmetaboliten der bakteriellen Proteinfermentation sind. Nahezu 30,0 % des Proteinabbaus wurden in SCFA umgewandelt, wobei zwischen 16,0 und 21,0 % davon verzweigtkettige Fettsäuren (BCFA) waren (Macfarlane *et al.* 1992a). BCFA werden ausschließlich durch die Metabolisierung von verzweigtkettigen Aminosäuren wie Valin, Leucin und Isoleucin gebildet. Infolgedessen können sie als Marker zur Beurteilung der SCFA Produktion aus Protein im Dickdarm herangezogen werden (Macfarlane *et al.* 1992a, Blachier *et al.* 2007). Umfangreiche Mengen an BCFA können durch die Strickland Reaktion, bei der es sich um eine gekoppelte Gärung zweier verschiedener Aminosäuren bei gleichzeitiger Desaminierung handelt, von vielen Bakterien der Familie *Clostridiaceae* gebildet werden (Nisman 1954, Elsdon und Hilton 1978). Über die Metabolisierung und Funktion von BCFA in Kolonepithelzellen ist nur wenig bekannt. Aus den Ergebnissen einer Untersuchung mit isolierten Kolonzellen

---

schlussfolgerten die Autoren, dass *i*-Buttersäure als Energiequelle genutzt werden kann, wenn *n*-Buttersäure nicht verfügbar ist (Jaskiewicz *et al.* 1996). *In vitro* zeigten *i*-Buttersäure und *i*-Valeriansäure im Vergleich zu *n*-Buttersäure keine erkennbaren Effekte auf die Proliferation, Differenzierung sowie Apoptose auf vom Menschen stammende Kolonkarzinom-Zellkulturen (Heerdt *et al.* 1994, Siavoshian *et al.* 1997). Zudem konnte festgestellt werden, dass *i*-Buttersäure einen stimulierenden Effekt auf die Na<sup>+</sup> Absorption im proximalen Kolon induziert (Musch *et al.* 2001, Zaharia *et al.* 2001). Bei Ferkeln, denen *Lactobacillus fermentum* I5007 verabreicht wurde, konnte nach 14 Tagen eine signifikante Steigerung der jejunalen Villushöhe sowie höhere Konzentrationen an *i*-Buttersäure und *i*-Valeriansäure in der Digesta des Kolons festgestellt werden. Hieraus leiteten die Autoren ab, dass BCFA die intestinale Integrität steigern können (Liu *et al.* 2014). Zu SCFA ist allgemein bekannt, dass sie die epitheliale Proliferation sowie Barrierefunktion stimulieren und die Immunantwort modulieren. Zudem werden Essigsäure, Propionsäure und *n*-Buttersäure schnell aus dem Darmlumen absorbiert und haben unterschiedliche Wirkung auf den Stoffwechsel des Wirtsorganismus. *n*-Buttersäure wird insbesondere von Bakterien des Phylum *Firmicutes* unter Verwendung des Enzyms Butyryl-CoA:acetate CoA-transferase, oder seltener über die Phosphotransbutyrylase und Butyratkinase, gebildet (Louis *et al.* 2014). *n*-Buttersäure wird in erster Linie von den Mucosaepithelzellen des Kolons metabolisiert und zu 70,0- 90,0 % von den Kolonzyten als Hauptenergiequelle genutzt (Cook und Sellin 1998, Hamer *et al.* 2008, Willing und Van Kessel 2010). Essigsäure fungiert vorwiegend als Vorläufer für die Fettsäuresynthese. Propionsäure wird insbesondere für die Glukoneogenese in der Leber verstoffwechselt. Die Produktion von SCFA beeinflusst den luminalen pH-Wert im Kolon und kann die Zusammensetzung der Mikrobiota des Kolons regulieren. So wurde die Hemmung pH-sensitiver pathogener Bakterien wie Clostridien beschrieben (Fan *et al.* 2015), allerdings liegen dazu für den Hund, unseres Wissens nach, keine spezifischen Daten vor. Ein Überschuss an SCFA kann zur Ansäuerung des Gewebes führen und daraus resultierend ein Anschwellen der Zellen und Nekrose verursachen (Argenzio und Eisemann 1996).

Neben Ammoniak entstehen während der bakteriellen Fermentation von Protein weitere Gase wie Wasserstoff, Kohlendioxid, Methan, Schwefelwasserstoff oder Methylmerkaptan (Zentek 1995c, Blachier *et al.* 2007). Ein Teil dieser Gase diffundiert über die Darmwand in das Blut und wird über die Lunge abgeatmet (Zentek 1995b, Stein 2006). Wasserstoff wird zudem von syntrophen nitrat- und sulfatreduzierenden Mikroorganismen sowie methanproduzierenden und acetogenen Bakterien verstoffwechselt (Macfarlane und Macfarlane 2003).

Biogene Amine können aus Aminosäuren durch die Abspaltung von Kohlendioxid, katalysiert durch Decarboxylasen, gebildet werden. Luminale Amine im Dickdarm können aus vier verschiedenen Quellen stammen: 1.) Diätetischen Ursprungs, 2.) Endogene Sekretion, 3.) Synthese durch die Mikrobiota des Dickdarms sowie 4.) Freigesetzt aus desquamierten Kolonzyten. Der relative Beitrag der einzelnen Quellen ist nicht genau bekannt (Blachier *et al.* 2007). In einer Untersuchung von kommerziell erhältlichem Dosenfutter für Hunde und Katzen konnte ein Histamingehalt zwischen 0,16 bis 65,5 µg/g festgestellt werden. Die ermittelten Gehalte waren allerdings zu gering um eine Histaminintoxikation auszulösen (Guilford *et al.* 1994). *In vivo* konnten bei gonotobiotischen Ratten keine signifikanten Effekte von bakteriell gebildeten Polyaminen auf die intestinale Morphologie festgestellt werden (Slezak *et al.* 2013). Polyamine sind essentiell für Funktion und Aufrechterhaltung des gastrointestinalen Epithels und haben Einfluss auf die Flüssigkeitssekretion durch Kolonkrypten (Cheng *et al.* 2004), postprandiale Kolonmotilität (Fioramonti *et al.* 1994) sowie die Zellproliferation (Seiler und Raul 2007). Amine werden schnell aus dem Intestinaltrakt absorbiert und im Mucosaepithel des Darms sowie in der Leber und den Nieren durch spezifische Mono- oder Diaminoxidasen metabolisiert und über den Harn ausgeschieden (Hughes *et al.* 2000, Seiler und Raul 2007). Über die pathophysiologischen Wirkungen von biogenen Aminen im Gastrointestinaltrakt ist nur wenig bekannt. Beim Schwein konnte gezeigt werden, dass Histamin die Sekretion von Chlorid über H<sub>2</sub>-Rezeptoren im proximalen Kolon induziert, was das Auftreten einer Diarrhoe begünstigen kann (Ahrens *et al.* 2003). Spermin, Spermidin, Cadaverin und Putrescin können die Wirkung von Histamin synergistisch durch eine kompetitive Hemmung des Monoaminoxidase-bedingten Abbaus verstärken. In diesem Zusammenhang wird beim Hund angenommen, dass bei alimentär bedingten Verdauungsstörungen insbesondere Histamin, aufgrund seiner proinflammatorischen, sekretionsfördernden und peristaltiksteigernden Wirkung, eine Bedeutung zukommt (Pietrzak *et al.* 2002).

Der fermentative Abbau von aromatischen Aminosäuren, wie Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, führt zur Bildung von Phenol- und Indolverbindungen (Blachier *et al.* 2007). *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium* und *Bifidobacterium* Spezies sind die Hauptproduzenten von Phenolverbindungen aus aromatischen Aminosäuren (Willing und Van Kessel 2010). Der Dickdarm stellt die Hauptlokalisation der endogen gebildeten Phenolverbindungen dar. Im Anschluss an die Absorption aus dem Darmlumen werden Phenolverbindungen durch Glucuronidierung und Sulfatkonjugation detoxifiziert und vorrangig als *p*-Cresol mit dem Harn ausgeschieden (Pieper *et al.* 2016). Phenol zeigt *in vitro* eine Steigerung der parazellulären Permeabilität und Reduktion der epithelialen

Barrierefunktion sowie Tumorpromotion (Hughes *et al.* 2008). Indol wird von einer Vielzahl grampositiver und gramnegativer Bakterien der Phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* und *Actinobacteria* produziert. Die Bildung wird durch das Enzym Tryptophanase katalysiert, das Tryptophan reversibel in Indol, Pyruvat und Ammoniak umwandeln kann (Lee und Lee 2010). Indol hat eine komplexe Wirkung auf den Wirt und dessen Mikrobiota, deren Bedeutung bei der Betrachtung der intestinalen Mikrobiota, aufgrund neuer Erkenntnisse aktueller Studien, zunimmt. Es fördert die Barrierefunktionen des Wirtsgewebes, hält die Homöostase des Darms aufrecht, steigert die Mukusproduktion, reduziert die Produktion von Entzündungsmarkern, stimuliert die Produktion von antiinflammatorischen Molekülen und erhöht die Expression einer Vielzahl von Genen, die mit dem Immunsystem assoziiert sind. Innerhalb der Mikrobiota fungiert Indol als Signalmolekül und steuert verschiedene Prozesse, wie antimikrobielle Reaktionen, Biofilmbildung, Motilität, Persistenzbildung, Plasmidstabilität und Virulenz (Darkoh *et al.* 2019). Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu den Konzentrationen ausgewählter Metaboliten des Proteinstoffwechsels beim Hund im Fäzes sowie bei *in vitro* Fermentation.

Tabelle 1: Luminale Metaboliten, die aus Aminosäurevorläufern im Dickdarm durch Fermentation gebildet werden können (Blachier *et al.* 2007)

Aminosäurevorläufer	Daraus gebildete Metaboliten bei Fermentation
Alanin	Essigsäure, Ethylamin, Propionsäure
Arginin	Agmatin, Stickoxid, Putrescin
Aspartat	Essigsäure, Succinat
Cystein	Sulfide
Glutamat	Essigsäure, Buttersäure
Glycin	Essigsäure, Methylamin
Histidin	Histamin
Isoleucin	2-Methylbutyrat
Leucin	<i>i</i> -Valeriansäure
Lysin	Essigsäure, Buttersäure, Cadaverin
Methionin	Sulfide
Phenylalanin	Phenylacetat, Phenylethylamin, Phenyllactat, Phenylpropionat, Phenylpyruvat
Threonin	Essigsäure, Propionsäure
Tryptophan	Indol, Indolacetat, Indolpropionat, 3-Methylindol (Skatol), Tryptamin
Tyrosin	4-Ethylphenol, Hydroxyphenylacetat, Hydroxyphenyllactat, Hydroxyphenylpropionat, Hydroxyphenylpyruvat, <i>p</i> -Cresol, Phenol, Tyramin
Valin	<i>i</i> -Buttersäure, 2-Methylbutylamin
Desaminierung von Aminosäuren	Ammoniak
Desaminierung und Fermentation von Aminosäuren	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , Lactat, Succinat, Formiat, Oxalacetat

Tabelle 2: Übersicht ausgewählter Metaboliten des Proteinstoffwechsels beim Hund (*in vivo* und *in vitro* Fermentation)

Metabolit	Konzentration	Versuchsdesign	Proteinkonz. (g/kg TS)	Hunde	Referenz
Ammoniak	101 <sup>a</sup> (µmol/g Fäzes)	<i>in vivo</i>	394- 549 (tP)	Beagle,	(Pietrzak 1997)
	95,7 <sup>a</sup> (µmol/g Fäzes)		412- 525 (pP)	Mischlinge	
	1079 (µg/g Fäzes)	<i>in vivo</i>	288 <sup>c</sup>	Beagle	(Hang <i>et al.</i> 2013)
	1191 (µg/g Fäzes)		655 <sup>c</sup>		
	835 (µg/g Fäzes)		214 <sup>c</sup>		
	0,70 (S), 0,70 (G), 1,00 (GS) (mg/g TS Fäzes)	<i>in vivo</i>	216 (pP)	S (Toy-Pudel, Jack Russel,	(Nery <i>et al.</i> 2012)
	0,80 (S), 0,70 (G), 1,40 (GS) (mg/g TS Fäzes)		382 (pP)	Zwergschnauzer),	
	0,70 (S), 0,80 (G), 1,20 (GS) (mg/g TS Fäzes)		214 (tP)	G (Riesenschnauzer),	
	1,20 (S), 1,60 (G), 2,10 (GS) (mg/g TS Fäzes)		392 (tP)	GS (DSH)	
	0,61 (g/100 g Fäzes)	<i>in vivo</i>	306 <sup>c</sup>	(DSH, Zwergschnauzer,	(Simpson <i>et al.</i> 2002)
0,69 (g/100 g Fäzes)	303 <sup>c</sup> (FD)		Englischer Setter)		
40,3 (mmol/l Fermentationsflüssigkeit)	<i>in vitro</i>	229	nn	(Pinna <i>et al.</i> 2016)	
41,6 (mmol/l Fermentationsflüssigkeit)		(24 h)			304
41,0 <sup>a</sup> (µmol/ml Fermentationsflüssigkeit)	<i>in vitro</i>	394- 549 (tP)	nn	(Pietrzak 1997)	
26,8 <sup>a</sup> (µmol/ml Fermentationsflüssigkeit)		(24 h)			412- 525 (pP)
Putrescin	524 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)	<i>in vivo</i>	394- 549 (tP)	Beagle,	(Pietrzak 1997)
	669 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)		412- 525 (pP)	Mischlinge	
	575 <sup>a</sup> (nmol/ml Fermentationsflüssigkeit)	<i>in vitro</i>	394- 549 (tP)	nn	(Pietrzak 1997)
	227 <sup>a</sup> (nmol/ml Fermentationsflüssigkeit)		(24 h)		
Cadaverin	146 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)	<i>in vivo</i>	394- 549 (tP)	Beagle,	(Pietrzak 1997)
	141 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)		412- 525 (pP)	Mischlinge	
	81,7 <sup>a</sup> (nmol/ml Fermentationsflüssigkeit)	<i>in vitro</i>	394- 549 (tP)	nn	(Pietrzak 1997)
	39,3 <sup>a</sup> (nmol/ml Fermentationsflüssigkeit)		(24 h)		
Histamin	178 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)	<i>in vivo</i>	394- 549 (tP)	Beagle,	(Pietrzak 1997)
	125 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)		412- 525 (pP)	Mischlinge	
Spermidin	335 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)	<i>in vivo</i>	394- 549 (tP)	Beagle,	(Pietrzak 1997)
	231 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)		412- 525 (pP)	Mischlinge	
	10,3 <sup>a</sup> (nmol/ml Fermentationsflüssigkeit)	<i>in vitro</i>	394- 549 (tP)	nn	(Pietrzak 1997)
	12,3 <sup>a</sup> (nmol/ml Fermentationsflüssigkeit)		(24 h)		

Metabolit	Konzentration	Versuchsdesign	Proteinkonz. (g/kg TS)	Hunde	Referenz
Spermin	154 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)	<i>in vivo</i>	394- 549 (tP)	Beagle, Mischlinge	(Pietrzak 1997)
	99,7 <sup>a</sup> (nmol/g Fäzes)		412- 525 (pP)		
SCFA total	195 (mmol/g Fäzes)	<i>in vivo</i>	288 <sup>c</sup>	Beagle	(Hang <i>et al.</i> 2013)
	137 (mmol/g Fäzes)		655 <sup>c</sup>		
	176 (mmol/g Fäzes)		214 <sup>c</sup>		
	3,11 (g/100 g Fäzes)	<i>in vivo</i>	306 <sup>c</sup>	(DSH, Zwergschnauzer, Englischer Setter)	(Simpson <i>et al.</i> 2002)
	4,33 (g/100 g Fäzes)		303 <sup>c</sup> (FD)		
	37,7 (mmol/l Fermentationsflüssigkeit)	<i>in vitro</i> (24 h)	229	nn	(Pinna <i>et al.</i> 2016)
35,5 (mmol/l Fermentationsflüssigkeit)	304				
65,0 <sup>a</sup> (µmol/ml Fermentationsflüssigkeit)	<i>in vitro</i> (24 h)	394- 549 (tP)	nn	(Pietrzak 1997)	
54,5 <sup>a</sup> (µmol/ml Fermentationsflüssigkeit)		412- 525 (pP)			
BCFA	8,30 (mmol/g Fäzes)	<i>in vivo</i>	288 <sup>c</sup>	Beagle	(Hang <i>et al.</i> 2013)
	13,1 (mmol/g Fäzes)		655 <sup>c</sup>		
	8,20 (mmol/g Fäzes)		214 <sup>c</sup>		
	4,80 (S), 7,50 (G), 5,90 (GS) (µmol/g TS Fäzes)	<i>in vivo</i>	216 (pP)	S (Toy-Pudel, Jack Russel, Zwergschnauzer), G (Riesenschnauzer), GS (DSH)	(Nery <i>et al.</i> 2012)
	14,5 (S), 19,6 (G), 17,8 (GS) (µmol/g TS Fäzes)		382 (pP)		
	16,3 (S), 21,9 (G), 20,2 (GS) (µmol/g TS Fäzes)		214 (tP)		
12,4 (S), 20,6 (G), 16,3 (GS) (µmol/g TS Fäzes)		392 (tP)			
Indol	0,90 (S), 0,60 (G), 1,20 (GS) (µmol/g TS Fäzes) <sup>b</sup>	<i>in vivo</i>	216 (pP)	S (Toy-Pudel, Jack Russel, Zwergschnauzer), G (Riesenschnauzer), GS (DSH)	(Nery <i>et al.</i> 2012)
	0,80 (S), 0,90 (G), 1,20 (GS) (µmol/g TS Fäzes) <sup>b</sup>		382 (pP)		
	1,30 (S), 0,70 (G), 1,30 (GS) (µmol/g TS Fäzes) <sup>b</sup>		214 (tP)		
	1,80 (S), 1,20 (G), 1,70 (GS) (µmol/g TS Fäzes) <sup>b</sup>		392 (tP)		
	116,1 (ppm Fäzes)	<i>in vivo</i>	306 <sup>c</sup>	(DSH, Zwergschnauzer, Englischer Setter)	(Simpson <i>et al.</i> 2002)
57,9 (ppm Fäzes)	303 <sup>c</sup> (FD)				
Phenol <sup>1</sup>	0,00 (S), 0,00 (G), 0,40 (GS) (µmol/g TS Fäzes)	<i>in vivo</i>	216 (pP)	S (Toy-Pudel, Jack Russel, Zwergschnauzer), G (Riesenschnauzer), GS (DSH)	(Nery <i>et al.</i> 2012)
	0,00 (S), 0,00 (G), 0,00 (GS) (µmol/g TS Fäzes)		382 (pP)		
	0,00 (S), 0,00 (G), 0,50 (GS) (µmol/g TS Fäzes)		214 (tP)		
	0,00 (S), 0,00 (G), 0,20 (GS) (µmol/g TS Fäzes)		392 (tP)		

Proteinkonz. = Proteinkonzentration der Versuchsdiaät; tP = Diät mit tierischer Proteinquelle; pP = Diät mit pflanzlicher Proteinquelle; nn = nicht genannt; FD = Diät wurde mit Faserquellen angereichert; DSH = Deutscher Schäferhund; <sup>1</sup> = Summe von Phenol, *p*-Cresol, 4-Ethylphenol; <sup>a</sup> = gebildeter Mittelwert aus den Ergebnissen von drei verschiedenen Diäten; <sup>b</sup> = Summe von Indol und Skatol; <sup>c</sup> = Wert von Originalsubstanz auf TS umgerechnet

### 2.2.3 Einflussfaktoren auf die bakterielle Fermentation von Protein

Im Körper erreicht unverdautes Protein der Nahrung sowie endogenes Protein in Form von Pankreassekret, desquamierten Enterozyten und Mukusprotein, mit der Passage des Chymus den Dickdarm. Untersuchungen beim Hund haben gezeigt, dass die Menge an unverdaulichem Protein, die den Dickdarm erreicht, zwischen 218 und 650 g/kg der Trockensubstanz im Ileumchymus liegen kann (Zentek 1995a). Dabei hängt die Menge des Proteins im Ileumchymus von der Aufnahme der Trockensubstanz, der Proteinkonzentration im Futter (Yamka *et al.* 2003) und der Verdaulichkeit des Proteins ab. Bei einer vermehrten Aufnahme von Protein, oder auch bei geringer präzäkaler Verdaulichkeit, kann die Verdauungs- und Absorptionskapazität des Dünndarms überschritten werden, was zu einer gesteigerten Anflutung von unverdaulichem Protein in den Dickdarm führen kann. Darüber hinaus ist die Aufnahme einer großen Menge an Trockensubstanz mit einer schnelleren Passagezeit der Digesta im Gastrointestinaltrakt assoziiert, was zu einer vermehrten Anflutung von präzäkal unverdaulichem Protein im Kolon führt (Hussein und Sunvold 2000). In diesem Zusammenhang steht auch der Einfluss der physischen Eigenschaften der Digesta (Partikelgröße, -form, Deformierbarkeit und Viskosität) auf die Passagezeit sowie die Durchmischung und Effizienz der Nährstoffabsorption (Lentle und Janssen 2008). Zudem konnte in einer Untersuchung beim Schwein festgestellt werden, dass eine hohe Pufferkapazität des Futters die Verdaulichkeit von Aminosäuren im Ileum senkt (Blank *et al.* 1999). Somit kann angenommen werden, dass bei der Aufnahme von Futter mit einer hohen Pufferkapazität mehr Aminosäuren mit dem Chymus in den Dickdarm gelangen.

Die Verdaulichkeit von Protein, und damit folglich dessen Influx in den Dickdarm, wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Von Bedeutung sind die Struktur und Quelle des Proteins, die Interaktion mit weiteren Futterbestandteilen, wie fermentierbaren Kohlenhydraten, sowie die technologische Verarbeitung des Futtermittels. Für den Hund ist bekannt, dass sowohl tierische, als auch pflanzliche Proteinquellen, eine große Variation in der Verdaulichkeit aufweisen. Die Komplexität der Tertiärstruktur des Proteins bestimmt dabei maßgeblich die Zugänglichkeit für die Verdauungsenzyme und damit dessen Verdaulichkeit. So wurde aufgrund der enthaltenen Keratine, die aus zahlreichen mehrfach quervernetzten Peptidketten bestehen, die geringste Gesamtverdaulichkeit von tierischen Proteinquellen bei Hornmehl (60,0 %) und aufgeschlossenem Federmehl (50,0- 65,0 %) festgestellt. Im Vergleich dazu wurde die höchste scheinbare Gesamtverdaulichkeit bei frischem Fleisch (98,0 %) und frischen Organen, wie Leber und Lunge (95,0 %), analysiert (Meyer und Zentek 2016). Proteine pflanzlichen Ursprungs besitzen in verarbeiteter Form als Proteinkonzentrate

aus Futterleguminosen, wie Soja und Erbsen, oder als Nebenprodukte der Stärkeproduktion, wie Weizengluten und Maiskleber, eine sehr hohe Verdaulichkeit. In einer Verdauungsstudie mit Hunden konnte eine höhere Gesamtverdaulichkeit für Maiskleber (93,8 %) im Vergleich zu Grießenmehl (92,4 %) festgestellt werden (Zentek 1995a). Eine thermische Behandlung von Protein, die zu einer leichten Denaturierung und damit einer besseren Zugänglichkeit für Verdauungsenzyme führt, kann die Verdaulichkeit steigern. So ist bei Sojaprotein eine Hitzebehandlung zur Inaktivierung von Trypsininhibitoren und Denaturierung der Globuline und Lektine obligat (Tran *et al.* 2008). Eine Studie mit Hunden konnte eine scheinbare Gesamtverdaulichkeit von Protein aus rohen Sojabohnen von 78,9 % analysieren. Für Sojabohnen, die mit einer Temperatur von 120 bis 125 °C behandelt wurden, ergab sich eine Zunahme auf 84,7 % (Félix *et al.* 2013). In Abhängigkeit von der Temperatur und Einwirkzeit nimmt jedoch das Ausmaß der Maillardreaktion, der Hauptmechanismus, der für eine Verringerung der Proteinqualität verantwortlich ist, zu (Tran *et al.* 2008). In einer Studie, in der eine Futtermischung, bestehend aus tierischen und pflanzlichen Futtermehlen, die nur mit Wasser gelöst und nicht wärmebehandelt, bei 140 °C extrudiert oder bei 52,0 °C pelletiert, an Hunde verfüttert wurde, konnte eine scheinbare Stickstoffverdaulichkeit von  $77,1 \pm 3,60$  %,  $72,4 \pm 4,10$  % und  $78,4 \pm 4,00$  % festgestellt werden (Stroucken *et al.* 1996). Des Weiteren ist die Verdaulichkeit von Protein beim Hund beeinflusst durch endogene Faktoren, wie das Alter (Maria *et al.* 2017), die Rasse und die Körpergröße (Meyer *et al.* 1999, Zentek *et al.* 2002, Weber *et al.* 2003). In einer Untersuchung, bei der ein Trockenfutter mit einem Rohproteingehalt von 392 g/kg TS an Hunde großer und kleiner Rassen gefüttert wurde, nahm die scheinbare Verdaulichkeit mit der Größe der Hunde zu. So zeigten Hunde der Rassen Zwergpudel und Mittelschnauzer eine scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins von  $81,5 \pm 1,90$  bis  $82,6 \pm 0,90$  % im Vergleich zu Deutschen Doggen und Riesenschnauzern von  $84,8 \pm 1,30$  bis  $85,9 \pm 0,90$  % (Weber *et al.* 2003). Diese Beobachtungen können beim Hund im Zusammenhang mit einem signifikanten Unterschied in der Dickdarmpassagezeit der Digesta in Abhängigkeit zur Körpergröße stehen. So konnte für Zwergpudel eine Dauer der Dickdarmpassage von  $9,10 \pm 1,10$  Stunden ermittelt werden und für Riesenschnauzer eine Zeit von  $39,4 \pm 1,60$  Stunden festgestellt werden (Hernot *et al.* 2006). Eine weitere Untersuchung konnte bei großen, verdauungssensiblen Hunden (Deutscher Schäferhund), im Vergleich zu Hunden kleinerer und mittlerer Rassen, eine höhere fäkale Konzentration von Ammoniak feststellen. Die höheren Gehalte an Ammoniak und anderen Proteinfermentationsprodukten (Valeriansäure, Phenol, Indol) lassen die Schlussfolgerung zu, dass bei großen Hunden die Proteinfermentation in einem größeren Ausmaß abläuft (Nery *et al.* 2012), was möglicherweise auch ihre erhöhte Neigung zu

Verdauungsstörungen erklärt. Ein altersabhängiger Unterschied in der Verdaulichkeit von pflanzlichen und tierischen Proteinquellen zeigte sich bei älteren Hunden, mit einem Alter von  $10,2 \pm 1,00$  Jahren, im Vergleich zu jüngeren Hunden, im Alter von  $2,60 \pm 0,90$  Jahren, durch höhere fäkale Konzentrationen von Putrescin, Cadaverin und Spermin (Maria *et al.* 2017). In einer weiteren Studie konnte bei Welpen im Alter von 60 Wochen im Vergleich zu elf Wochen ein Anstieg der Verdaulichkeit des Rohproteins mit zunehmendem Alter festgestellt werden (Weber *et al.* 2003). Darüber hinaus scheint die psychische Verfassung des Hundes die Verdaulichkeit zu beeinflussen.

### 2.3 Yucca schidigera

#### 2.3.1 Gewinnung und Zusammensetzung von *Yucca schidigera*

*Yucca schidigera* ist eine Pflanze, die zu der Familie *Agavaceae* zählt und im Südwesten der USA und Mexiko einheimisch ist. Die kommerzielle Produktion von *Yucca schidigera* Erzeugnissen findet überwiegend in Mexiko statt. Dazu wird der sukkulente Stamm der Pflanze gefällt und mechanisch aufgeweicht. Nachfolgend wird dieser entweder getrocknet und gemahlen als *Yucca* Pulver oder ausgepresst und der erhaltene Saft eingedampft als *Yucca schidigera* Extrakt vermarktet (Cheeke 2000). Der Begriff *Yucca schidigera* Extrakt ist jedoch nicht einheitlich definiert und wird in der Literatur zum Teil auch für *Yucca schidigera* Produkte verwendet, die der genannten Bezeichnung des *Yucca schidigera* Pulvers entsprechen. Das in dieser Arbeit eingesetzte handelsübliche *Yucca schidigera* Produkt entspricht, gemäß den Herstellerangaben zum Gewinnungsprozess, der Beschreibung des *Yucca schidigera* Pulvers.

*Yucca schidigera* ist bekannt für einen hohen Gehalt an Saponinen und zählt zu den wichtigsten kommerziellen Quellen für diese natürlichen Tenside (Cheeke 2000). *Yucca schidigera* Pulver beinhaltet acht verschiedene Saponine und einen Saponingehalt von etwa 10,0 %. Die biologische Aktivität der steroidalen *Yucca* Saponine wird dominiert durch Spirostanol Saponine, insbesondere Sarsapogenin 66,0 %, Glorigenin 24,0 % und Markogenin 3,50 %. In einem geringeren Anteil von etwa 6,80 % kommen Furostanol Saponine im *Yucca* Saponingemisch vor (Oleszek *et al.* 2001b). In der Rinde von *Yucca schidigera* konnten zudem die Phenolverbindungen Resveratrol (*trans*-3,5,4'-Trihydroxystilben), *trans*-3,3',5,5'-Tetrahydroxy-4'-Methoxystilben sowie Yuccaol A-E (Oleszek *et al.* 2001a, Piacente *et al.* 2005) und Yuccaone A (Piacente *et al.* 2002) nachgewiesen werden. Zwar wurden diese Phenolverbindungen in den bisher durgeführten

---

Untersuchungen nur in der Rinde nachgewiesen, jedoch kann aufgrund des Herstellungsprozesses von *Yucca* Produkten angenommen werden, dass diese Verbindungen in geringen Mengen auch in *Yucca* Pulver und *Yucca schidigera* Extrakt enthalten sind.

### 2.3.2 Einsatz von *Yucca schidigera* in der Tierernährung

*Yucca schidigera* Produkte werden als diätetischer Zusatz bei Nutz- und Haustieren, insbesondere zur Reduktion des Geruchs und Gehalts an Ammoniak der Exkremente, eingesetzt (Cheeke 2000). Zudem konnte in verschiedenen Studien durch den Zusatz von *Yucca schidigera* ein positiver Effekt auf das Wachstum, die Leistung und die Gesundheit der Tiere festgestellt werden (Johnston *et al.* 1981, Mirza *et al.* 2002, Çabuk *et al.* 2004, Aslan *et al.* 2005, Alagawany *et al.* 2016).

Der Wirkmechanismus von *Yucca schidigera* Produkten ist jedoch bis heute unklar und die für die biologische Aktivität verantwortlichen Verbindungen sind nicht eindeutig identifiziert (Piacente *et al.* 2005).

Ein möglicher Erklärungsansatz des Wirkmechanismus ist die Inhibition der bakteriellen Urease. In einer *in vitro* Untersuchung mit *Yucca schidigera* Extrakt (Alltech Inc., Nicholasville, USA) konnte jedoch nur eine schwache, unspezifische Hemmung der Urease festgestellt werden, wobei eine signifikante Hemmung nur bei Konzentrationen, die nicht für Futtermittel typisch sind, vorlag. Die Autoren schlussfolgerten aus den Ergebnissen, dass die inhibitorischen Eigenschaften zu gering sind, um die *in vivo* beobachteten Effekte zu begründen (Killeen *et al.* 1994). *In vivo* konnte bei der Verabreichung einer Diät mit 200 mg/kg *Yucca schidigera* Extrakt (Alltech Inc., Nicholasville, USA) an Ratten keine Veränderung der Ureaseaktivität im Dickdarm beobachtet werden (Killeen *et al.* 1998a). Das Ergebnis einer *in vitro* Studie, in der die Ureaseaktivität von drei *Helicobacter pylori* Stämmen durch den Zusatz von 400 µg/ml Resveratrol um 90,0 % reduziert wurde (Paulo *et al.* 2011), lässt die Vermutung zu, dass die schwache Ureaseinhibition auf das in *Yucca schidigera* enthaltene Resveratrol zurückgeführt werden kann.

Ein weiterer angenommener Mechanismus ist die Modulation der intestinalen Mikrobiota. *In vitro* konnte für die nachfolgenden Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt von Tieren eine Hemmung durch den Zusatz von *Yucca schidigera* Saponinextrakt identifiziert werden: *Bacillus pasteurii* (MHK 0,40- 0,60 mg/ml) (Killeen *et al.* 1998b), *Megasphaera elsdenii* (MHK 0,70 mg/ml), *Ruminococcus productus*, *Peptococcus asaccharolyticus*, *Selenomonas*

*ruminantium* (MHK 1,40 mg/ml), *Fusobacterium necrophorum* (MHK 1,80 mg/ml), *Eubacterium aerofaciens*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium sporogens* (MHK 3,50 mg/ml), *Clostridium innocuum*, *Veillonella parvula* (MHK 7,00 mg/ml), *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium varium*, *Clostridium perfringens* (MHK 14,0 mg/ml) (Katsunuma *et al.* 2000) und *Staphylococcus aureus* (MHK 12,5 mg/ml) (Hassan *et al.* 2010). Keine hemmende Wirkung konnte festgestellt werden gegenüber *Escherichia coli* (Sen *et al.* 1998, Katsunuma *et al.* 2000, Hassan *et al.* 2010), *Salmonella typhimurium* (Hassan *et al.* 2010), *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium thermophilum* sowie *Bifidobacterium longum* (Katsunuma *et al.* 2000). Es scheint, dass die antibakteriellen Effekte der Saponine eher auf membranolytischen Eigenschaften beruhen als auf einer Veränderung der Oberflächenspannung des extrazellulären Mediums. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass die inhibitorische Aktivität mit einer Adsorption der Saponine an die Bakterien assoziiert ist und durch die Dichte der mikrobiellen Population beeinflusst wird (Killeen *et al.* 1998b). Zu Saponinen ist darüber hinaus bekannt, dass sie nur schlecht resorbiert werden und ihre biologischen Effekte deshalb hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt lokalisiert sind. Sie bilden unlösliche Komplexe mit Cholesterol, anderen Sterolen und Gallensäuren und haben damit folglich Einfluss auf den Gehalt an Cholesterol im Blut (Piacente *et al.* 2005).

Zudem wird eine direkte Bindung von Ammoniak als Lösungsansatz beschrieben. *In vitro* konnte für die wasserlösliche, saponinfreie Fraktion eine Bindungsaktivität zu NH<sub>3</sub> von 85,0 % nachgewiesen werden und keine Aktivität für die in Butanol gelöste Saponinfraktion von *Yucca schidigera*. Die Ergebnisse zeigen, dass steroidale Saponine an diesem Wirkmechanismus nicht beteiligt sind. Der Autor nimmt für die Erklärung dieser Wirkung an, dass *Yucca schidigera* als Wüstenpflanze ein System entwickelt hat um den essentiellen flüchtigen Nährstoff Ammoniak bzw. den darin enthaltenen Stickstoff reversibel mit einer hohen Affinität und großen Kapazität zu binden (Headon 1991).

### 2.3.3 Wirkungen von *Yucca schidigera* beim Hund

Der Einfluss von *Yucca schidigera* auf den Kotgeruch beim Hund wurde in mehreren Untersuchungen betrachtet (Lowe und Kershaw 1997, Lowe *et al.* 1997, Dos Reis *et al.* 2016, Weber *et al.* 2016). In einer Studie mit einer Gruppe von vier Beaglen, die ein extrudiertes Standardtrockenfutter mit einem Proteingehalt von 270 g/kg und 0,25 g/kg *Yucca schidigera* Extrakt (Odor-Bloc™, Inroads International Limited, Whitchurch,

Großbritannien) für 23 Tage erhalten haben, erfolgte die Beurteilung des Fäkalgeruchs durch ein sensorisches Panel sowie über ein Odorogramm, erstellt mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie. Die Ergebnisse des humanen Panels zeigten eine leichte Tendenz zur Verbesserung des Geruchs während der Gabe von *Yucca schidigera*, jedoch konnte keine eindeutige signifikante Veränderung festgestellt werden. Die Autoren verweisen auf die begrenzte Anzahl an Wiederholungen (Lowe und Kershaw 1997). Die Auswertung mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie zeigte keine offensichtlichen Unterschiede vor und während der Gabe von *Yucca schidigera* Extrakt (Lowe *et al.* 1997). Eine weitere Untersuchung mit 20 Beaglen hat den Einfluss von drei *Yucca schidigera* Konzentrationen (0,25, 0,50, 0,75 g/kg TS) auf den Fäkalgeruch in Zusammenhang mit zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen (250 und 340 g/kg TS) eines extrudierten Trockenfutters über 20 Tage mittels humansensorischem Panel betrachtet. Die Gabe von 0,50 g/kg TS *Yucca schidigera* bei gleichzeitiger Fütterung der hohen Proteinkonzentration führte zu einer Reduktion des Kotgeruchs (Dos Reis *et al.* 2016).

Eine Reduktion der fäkalen Ammoniakkonzentration konnte bereits bei der Gabe von 0,25 g/kg TS *Yucca schidigera*, im Vergleich zur Kontrolle (0,28 g/100 g vs. 0,25 g/100 g TS Fäzes), nachgewiesen werden. Die stärkste Reduktion von Ammoniak (0,22 g/100 g TS Fäzes) wurde bei der Fütterung von 0,75 g/kg TS *Yucca schidigera* festgestellt (Dos Reis *et al.* 2016). In einer weiteren Untersuchung konnte nach einer zehntägigen Fütterung von 0,125 g/kg Saponinextrakt von *Yucca schidigera*, im Vergleich zur Kontrolle, eine deutliche Reduktion der fäkalen Konzentration von Ammoniak ( $56,4 \pm 7,20$  vs.  $30,3 \pm 2,50$  ppm) sowie Schwefelwasserstoff ( $15,0 \pm 2,40$  vs.  $6,00 \pm 0,70$  ppm) und Methylmercaptan ( $3,80 \pm 0,90$  vs.  $2,30 \pm 0,40$  ppm), die als Parameter zur Beurteilung des Kotgeruchs verwendet wurden, festgestellt werden. Zudem konnte in dieser Studie eine Verbesserung der Kotkonsistenz sowie ein Rückgang der Koprophagie, die über die fäkale Ausscheidung eines röntgendichten Markers (BIPS<sup>®</sup>) gemessen wurde ( $70,6 \pm 5,00$  % vs.  $93,1 \pm 5,20$  %), beobachtet werden (Weber *et al.* 2016). Der Effekt der Reduktion auf die Ammoniakkonzentration konnte in einer *in vitro* Untersuchung mit einem Inokulum aus Hundefäzes, das mit 0,10 g/l *Yucca schidigera* Extrakt (Syntonise S.P.A., Sintofarm, Guastalla, Italien) inkubiert wurde, nicht bestätigt werden. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde in dem Fermentationsansatz mit *Yucca schidigera* ein numerischer Anstieg der Ammoniakkonzentration von 41,3 mmol/l im Vergleich zum Kontrollansatz 38,2 mmol/l gemessen (Pinna *et al.* 2017).

Bei der Betrachtung der Wirkung von *Yucca schidigera* Extrakt auf die canine Mikrobiota konnte *in vitro* ein Anstieg von *Enterococcus* spp. nach sechs Stunden identifiziert werden.

Die Autoren machen jedoch darauf aufmerksam, dass derzeit in der Literatur keine Evidenz existiert, die suggeriert, dass *Yucca schidgera* als Präbiotikum wirkt und, dass der Mechanismus dieser Wirkung unbekannt ist (Pinna *et al.* 2017).

Eine Zusammenfassung weiterer Effekte, die beim Hund durch die Gabe von *Yucca schidigera* festgestellt werden konnten, ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Untersuchungen zur Wirkung von *Yucca schidigera* beim Hund (*in vivo* und *in vitro* Fermentation)

Dosierung	Versuchsdesign	Tieranzahl	Effekt	Referenz
0,10 g/l	<i>in vitro</i>	4	<i>Enterococcus</i> spp. nach 6 h ↑, <i>Lactobacillus</i> spp. nach 24 h ↓, <i>E. coli</i> nach 6 und 24 h →, biogene Amine →, nur Spermin nach 24 h ↓, flüchtige Fettsäuren →, nur <i>i</i> -Buttersäure nach 6 h ↓, Ammoniak nach 6 und 24 h →	(Pinna <i>et al.</i> 2017)
0,17 g/l	<i>in vitro</i>	2 6	Totale Gasproduktion →, Gehalt an Schwefelwasserstoff ↓,	(Giffard <i>et al.</i> 2001)
2,50 mg/ 5,00 kg KGW	<i>in vivo</i>	8	Anzahl und Häufigkeit an Flatulenz Episoden →, Durchschnittliches Intervall der Flatulenz freien Zeit →, Humane Geruchswahrnehmung ermittelt über H <sub>2</sub> S Konzentration der Flatulenz Episoden ↑ ( <i>Yucca schidigera</i> wurde in Kombination mit 320 mg Aktivkohle und 17 mg Zink gegeben)	
0,25 g/kg	<i>in vivo</i>	4	Kotgeruch (Odorogramm, Gaschromatografie mit Massenspektrometrie) →	(Lowe <i>et al.</i> 1997)
0,25 g/kg	<i>in vivo</i>	4	Kotgeruch (humansensorisches Panel) →	(Lowe und Kershaw 1997)
0,125 g/kg, 0,250 g/kg, 0,375 g/kg	<i>in vivo</i>	21	Fäkaler Wassergehalt (%) →, Fäkale Mineralexkretion Ca, P, Mg ↓, Na, K, Fe, Mn, Cu, Zn →	(Santos <i>et al.</i> 2013)
0,375 g/kg TS	<i>in vivo</i>	21	Harn pH →, sV TS, oS, Rp →, sV Rfe ↓	(Santos <i>et al.</i> 2016)
0,125 g/kg	<i>in vivo</i>	14	Koprophagie beurteilt über wiederfinden des BIPS <sup>®</sup> Markers ↑, Kotkonsistenz ↑, Fäkale Konzentration Schwefelwasserstoff, Methylmercaptan, Ammoniak ↓	(Weber <i>et al.</i> 2016)
0,25 g/kg TS, 0,50 g/kg TS, 0,75 g/kg TS	<i>in vivo</i>	20	Bei 0,50 g/kg Kotgeruch (humansensorisches Panel) ↑, Kotkonsistenz →, Fäkaler Ammonium-Stickstoff ↓, sV TS, oS, Rp, Rfe, Ra →, Intestinale Gasareale (röntgenologisch) bei 0,25 g/kg und 0,50 g/kg ↓, Intestinale Wandstärke (ultrasonografisch) →, bei 0,75 g/kg Hämatologie (MHC) und Serum-Biochemie (ALT, Cholesterol) ↑	(Dos Reis <i>et al.</i> 2016)

sV = scheinbare Verdaulichkeit; → = Unverändert; ↓ = Abfall bzw. Verschlechterung; ↑ = Anstieg bzw. Verbesserung; KGW = Körpergewicht

### 2.4 Inulin

#### 2.4.1 Gewinnung und chemische Struktur von Inulin

Inulin und Oligofruktose sind weit verbreitete Speicherkohlenhydrate in Gemüse (Chicorée, Artischocken, Zwiebeln, Knoblauch, Porree, Spargel), Getreide (Weizen, Roggen, Gerste) und Früchten (Banane) (Watzl *et al.* 2005, Singh und Singh 2010). Inulin kann aus Topinambur (*Helianthus tuberosus*) und Chicorée (*Cichorium intybus*) gewonnen werden, wobei die industrielle Produktion fast ausschließlich aus Chicorée erfolgt (Franck 2002, Kaur und Gupta 2002). Kommerziell verfügbares Inulin aus Chicorée enthält zwischen 150 und 200 mg/g Inulin und 80,0- 120 mg/g Oligofruktose (Flickinger *et al.* 2003b).

Inulin ist ein Oberbegriff unter dem alle  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) linearen Fruktane zusammengefasst werden (Roberfroid 2005). Es stellt ein Gemisch von linearen Fruktosepoly- und -oligomeren dar, in dem die Fruktoseeinheiten  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) gebunden sind. Am Ende jeder Fruktosekette ist zusätzlich ein  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) gebundenes Glukose-Molekül lokalisiert (Niness 1999). Die Kettenlänge von Inulin kann in Abhängigkeit des Polymerisationsgrades (DP) bis zu 60 Monosaccharideinheiten betragen und liegt im Durchschnitt bei 12. Davon zu unterscheiden sind Fruktooligosaccharide (FOS) mit einem Polymerisationsgrad von unter 9, die als Oligofruktose bezeichnet werden (Gibson und Roberfroid 1995). Oligofruktose ist immer in Inulin präsent. In der vorliegenden Studie wurde ein handelsübliches kurzkettiges Inulinprodukt aus Chicorée verwendet, dass nach Angaben des Herstellers zu 25,0 % eine DP > 10 und 75,0 % < 10 aufweist.

#### 2.4.2 Einsatz von Inulin in der Tierernährung

Inulin wird in Lebensmitteln aufgrund seiner technologischen Eigenschaften (Fett- und Zuckerersatz, Verbesserung des Geschmacks und der Textur (Franck 2002)) und seiner funktionellen Eigenschaften (Verbesserung der Mineralstoffabsorption, Interaktion mit der Fettverdauung, Einfluss auf die Darmgesundheit (Loo *et al.* 1999)) eingesetzt. In Futtermitteln für Hunde und Katzen wird es zur Manipulation der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota, Stimulation der Darmintegrität, Beeinflussung des Stickstoffmetabolismus und Reduktion von abstoßendem Fäkalgeruch zugesetzt (Hussein *et al.* 1999, Flickinger *et al.* 2003a).

---

Die besonderen funktionellen Eigenschaften von Inulin beruhen auf den  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) glykosidischen Bindungen. Diese Bindungen bewahren Inulin vor der normalen Kohlenhydratverdauung und sind verantwortlich für den niedrigen Energiegehalt sowie den Effekt als diätetischer Faserstoff (Niness 1999). Bei Monogastriern können die körpereigenen Enzyme des Intestinaltrakts die  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) glykosidischen Bindungen nicht hydrolytisch spalten (Okey 1919, Bach Knudsen und Hesso 1995, Ellegård *et al.* 1997), sodass mit der Nahrung aufgenommenes Inulin nahezu vollständig unverdaut den Dickdarm erreicht und erst dort durch die Mikrobiota fermentativ abgebaut wird (Nilsson und Björck 1988, Beynen *et al.* 2002). Aufgrund dieser Eigenschaft kann Inulin als diätetische Faser klassifiziert werden. Zwar existiert derzeit keine international einheitliche Definition für den Begriff, jedoch entspricht es der physiologisch basierten Beschreibung, dass es sich um diätetische Bestandteile handelt, die im Magen und Dünndarm nicht enzymatisch zu absorbierbaren Untereinheiten abgebaut werden können (Howarth *et al.* 2001). In zahlreichen Untersuchungen bei Monogastriern konnte ein bifidogener Effekt von Inulin im Dickdarm festgestellt werden (Gibson und Roberfroid 1995, Kleessen *et al.* 1997, Roberfroid *et al.* 1998, Kruse *et al.* 1999, Harmsen *et al.* 2002, Kleessen *et al.* 2007), in Verbindung mit einer vermehrten Bildung von kurzkettigen Fettsäuren und Senkung des intestinalen pH-Werts (Gibson und Roberfroid 1995, Delzenne 2003, Rossi *et al.* 2005, Barszcz *et al.* 2016). In diesem Zusammenhang konnte auch festgestellt werden, dass Bifidobakterien die Anzahl an pathogenen Bakterien, wie *E. coli* und Clostridien, durch eine kompetitive Hemmung senken (Wang und Gibson 1993, Gibson und Roberfroid 1995). Darüber hinaus konnte eine Modulation des Immunsystems beobachtet werden (Kelly-Quagliana *et al.* 2003). Durch die angeführten Wirkungen entspricht Inulin der Definition für diätetische Präbiotika der International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP): „Diätetische Präbiotika sind selektive fermentierbare Bestandteile, die zu einer spezifischen Änderung in der Zusammensetzung und / oder Aktivität der gastrointestinalen Mikrobiota führen, und dadurch einen (oder mehrere) Vorteil(e) für die Gesundheit des Wirtsorganismus übertragen“ (Gibson *et al.* 2010). Entsprechend dieser Definition ist die Klassifizierung von Inulin als diätetisches Präbiotikum beim Hund als kritisch anzusehen, da die Ergebnisse verschiedener Studien nicht deckungsgleich eine positive Veränderung der Zusammensetzung sowie Stoffwechselaktivität der Mikrobiota bestätigen.

### 2.4.3 Wirkungen von Inulin beim Hund

Die Wirkungen von Inulin als Präbiotikum beim Hund wurden in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien betrachtet, Tabelle 4 gibt dazu eine Übersicht.

Die Untersuchungen zum Einfluss auf die Zusammensetzung der caninen Mikrobiota haben gezeigt, dass der zu erwartende Anstieg an Bifidobakterien nur bei einem moderaten Rohproteingehalt (bis 312 g/kg TS) der aufgenommenen Grundration festgestellt werden konnte (Zentek *et al.* 2003, Barry *et al.* 2009, Inness *et al.* 2011). In einer Untersuchung mit einem Rohproteingehalt der Grundration von 352 g/kg TS und einem Zusatz von 9,00 g/kg Inulin konnten keine Bifidobakterien identifiziert werden (Vanhoutte *et al.* 2005). In diesem Zusammenhang konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass mit steigender Menge an aufgenommenem Protein das Wachstum von unerwünschten Bakterien, wie *Clostridium perfringens*, gefördert wird und sich eine Tendenz zu einem geringeren fäkalen Gehalt an Bifidobakterien darstellt (Zentek 1995b, Zentek *et al.* 1998b, Zentek *et al.* 2003, Zentek *et al.* 2004).

*In vitro* Untersuchungen mit verschiedenen Inulinprodukten als Substrat und fäkalem Inokulum vom Hund zeigten einheitlich eine gesteigerte Produktion von kurzkettigen Fettsäuren (Vickers *et al.* 2001, Biagi *et al.* 2010, Inness *et al.* 2011). Die Ergebnisse bei *in vivo* Untersuchungen zur Bildung von kurzkettigen Fettsäuren differieren. In einer Untersuchung konnte bereits bei der Gabe von 3,00 g/kg eines Inulinprodukts (Rafliline HPF, Beneo-Orafti S.A., Tienen, Belgien) ein Anstieg beobachtet werden (Propst *et al.* 2003), wohingegen in einer zweiten Untersuchung mit der Gabe von 4,00 g/kg (Raftilene ST, Beneo-Orafti S.A., Tienen, Belgien) kein höherer Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren und ein leichter Anstieg des fäkalen pH-Werts festgestellt wurde (Barry *et al.* 2009). In zwei weiteren *in vivo* Untersuchungen zeigte sich nach der Fütterung von 15,0 g/kg eines Inulinprodukts (Raftifeed® IPS, DP 2- 60, Beneo-Orafti S.A., Tienen, Belgien) bzw. 30,0 g/kg getrocknetem Chicorée mit einem Inulingehalt von 55,0 % ein Abfall des fäkalen pH-Werts. Im Rahmen dieser Studien wurde jedoch keine Analyse der kurzkettigen Fettsäuren durchgeführt, sodass ein Rückschluss auf den pH-Wert Abfall nicht möglich ist (Zentek *et al.* 2003, Verlinden *et al.* 2006).

Bei der Betrachtung des Einflusses von Inulinprodukten auf die bakterielle Proteinfermentation konnte festgestellt werden, dass der fäkale Gehalt an verzweigt-kettigen Fettsäuren erhöht und von Phenol sowie Indol gesenkt wurde (Propst *et al.* 2003, Barry *et al.* 2009). Die Ergebnisse zum fäkalen Ammoniakgehalt sind hingegen konträr.

Die scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins hat bei *in vivo* Untersuchungen von Diäten mit dem Zusatz von Inulinprodukten und einem moderaten Rohproteingehalt der Grundration von maximal 245 g/kg TS abgenommen (Diez *et al.* 1998, Verlinden *et al.* 2006). In einer weiteren Untersuchung mit einem Rohproteingehalt der Grundration von 311 bzw. 312 g/kg TS konnte eine Steigerung der scheinbaren Verdaulichkeit des Rohproteins ermittelt werden (Barry *et al.* 2009).

Die fäkale Trockensubstanz hat bei allen Untersuchungen durch die Gabe von Inulin abgenommen. Die einzelnen Ergebnisse der Kotkonsistenz, erfasst durch ein Punktbewertungsverfahren, liegen im Durchschnitt bei 2,9 von 5,0 Punkten, wobei sich die Tendenzen zum Einfluss von Inulin in den Untersuchungen gegensätzlich darstellen (Diez *et al.* 1998, Propst *et al.* 2003, Zentek *et al.* 2003, Verlinden *et al.* 2006). Somit wurde in den Untersuchungen bei der Gabe von Inulin ein eher feuchter und schlecht geformter Kot beobachtet.

Tabelle 4: Untersuchungen zur Wirkung von Inulin beim Hund (*in vivo* und *in vitro* Fermentation)

Inulin-konzentration	Protein-konz. (g/kg TS)	Versuchs-design	Tier-anzahl	Effekt	Referenz
0,00 g/kg 70,0 g/kg (TS)	245 236	<i>in vivo</i>	8	TS fäkal: 34,4 (0), 27,0 (70,0) (%), sV oS total: 91,1 (0), 89,6 (70,0) (%), sV Rp total: 90,9 (0), 88,3 (70,0) (%), sV Rfe total: 95,9 (0), 94,3 (70,0) (%)	(Diez <i>et al.</i> 1998)
0,00 g/kg 0,00 g/kg 15,0 g/kg	726 259 265	<i>in vivo</i>	9	Kotkonsistenz: 2,7 (0   726), 3,8 (0   259) 3,8 (15,0   265), TS fäkal: 30,9 (0   726), 36,8 (0   259), 36,1 (15,0   265) (%), pH fäkal: 7,11 (0   726), 6,15 (0   259), 6,39 (15,0   265), <i>C. perfringens</i> fäkal: 8,2- 8,8 (0   726), 3,3- 4,0 (0   259), 3,5- 3,9 (15,0   265) (log KBE/g), Bifidobakterien fäkal: < 6,0- 8,6 (0   726), - < 6,0- 9,6 (0   259), 9,0- 10,1 (15,0   265) (log KBE/g)	(Zentek <i>et al.</i> 2003)
0,00 g/kg 3,00 g/kg 6,00 g/kg 9,00 g/kg	352 <sup>c</sup>	<i>in vivo</i>	7	Kotkonsistenz: 2,6 (0), 2,8 (3,00), 2,8 (6,00), 2,7 (9,00), sV Rp ileal: 51,3 (0), 63,5 (3,00), 62,7 (6,00), 59,3 (9,00) (%), sV Rp total: 81,7 (0), 76,2 (3,00), 79,7 (6,00), 79,0 (9,00) (%), SCFA total: 406 (0), 472 (3,00), 469 (6,00), 472 (9,00) (µmol/g TS Fäzes), BCFA total: 43,4 (0), 43,9 (3,00), 45,0 (6,00), 46,0 (9,00) (µmol/g TS Fäzes), Ammoniak: 222,5 (0), 248,4 (3,00), 259,2 (6,00), 258,6 (9,00) (µmol/g TS Fäzes), Amine total <sup>2</sup> : 8,42 (0), 9,01 (3,00), 9,5 (6,00), 10,68 (9,00) (µmol/g TS Fäzes), Phenol total <sup>3</sup> : 3,03 (0), 1,86 (3,00), 1,97 (6,00), 2,23 (9,00) (µmol/g TS Fäzes), Indol: 20,0 (0), 21,5 (3,00), 17,1 (6,00), 19,6 (9,00) (µmol/g TS Fäzes)	(Propst <i>et al.</i> 2003)
0,00 g/kg 0,00 g/kg 30,0 g/kg 30,0 g/kg	180 144 185 140	<i>in vivo</i>	16	Kotkonsistenz: 2,9 (0   180), 2,9 (0   144), 2,6 (30,0   185), 2,8 (30,0   140), TS fäkal: 40,8 (0   180), 40,3 (0   144), 36,7 (30,0   185), 34,7 (30,0   140) (%), pH fäkal: 7,1 (0   180), 6,9 (0   144), 6,9 (30,0   185), 6,7 (30,0   140), sV Rp total: 85,4 (0   180), 83,4 (0   144), 84,5 (30,0   185), 79,7 (30,0   140) (%)	(Verlinden <i>et al.</i> 2006)

Inulin-konzentration	Protein-konz. (g/kg TS)	Versuchs-design	Tier-anzahl	Effekt	Referenz
0,00 g/kg 2,00 g/kg 4,00 g/kg	320 312 311	<i>in vivo</i>	5	sV Rp ileal: 78,4 (0), 80,3 (2,00), 81,5 (4,00) (%), sV Rp total: 88,7 (0), 88,9 (2,00), 89,6 (4,00) (%), SCFA total: 411 (0), 290 (2,00), 318 (4,00) (µmol/g TS Fäzes), BCFA total: 43,6 (0), 38,7 (2,00), 46,2 (4,00) (µmol/g TS Fäzes), pH ileal: 7,20 (0), 7,29 (2,00), 7,34 (4,00), pH fäkal: 6,55 (0), 6,67 (2,00), 6,95 (4,00), Ammoniak ileal: 2,41 (0), 2,88 (2,00), 2,70 (4,00) (mg/g TS Digesta), Ammoniak fäkal: 3,38 (0), 3,29 (2,00), 3,27 (4,00) (mg/g TS Fäzes), Phenol fäkal: 39,5 (0), 38,2 (2,00), 17,6 (4,00) (µmol/g TS Fäzes), Indol fäkal: 479 (0), 407 (2,00), 453 (4,00) (µmol/g TS Fäzes), <i>C. perfringens</i> fäkal: 10,1 (0), 9,60 (2,00), 9,80 (4,00) (log KBE/g), <i>Bifidobacterium</i> spp. fäkal: 8,80 (0), 9,20 (2,00), 9,10 (4,00) (log KBE/g), <i>Lactobacillus</i> spp. fäkal: 11,2 (0), 11,2 (2,00), 11,3 (4,00) (log KBE/g), <i>Escherichia coli</i> fäkal: 11,1 (0), 11,2 (2,00), 11,4 (4,00) (log KBE/g)	(Barry <i>et al.</i> 2009)
14,0 g/kg (TS)	250- 300	<i>in vivo</i>	6	<i>Fusobacteria</i> : 39,0 (R 0), 50,0 (R 14,0), 51,5 (H 0), 29,2 (H 14,0) (%), <i>Firmicutes</i> : 37,9 (R 0), 37,2 (R 14,0), 27,4 (H 0), 52,5 (H 14,0) (%), <i>Bacteroidetes</i> : 15,0 (R 0), 6,5 (R 14,0), 14,6 (H 0), 11,9 (H 14,0) (%), <i>Proteobacteria</i> : 5,59 (R 0), 4,05 (R 14,0), 5,56 (H 0), 5,07 (H 14,0) (%), <i>C. perfringens</i> : 0,27 (R 0), 0,04 (R 14,0), 0,08 (H 0), 0,20 (H 14,0) (%); Nachweis mittels qPCR, Angabe in % von den Gesamtsequenzen.	(Beloshapka <i>et al.</i> 2013)
0,00 g/l, 10,0 g/l (DP Ø 9), 10,0 g/l (DP Ø 9), 10,0 g/l (DP > 12), 10,0 g/l (DP 2- 8)	263°	<i>in vitro</i> (24 h)	3	Essigsäure: 0,04 (0), 3,22 (DP Ø 9), 3,24 (DP Ø 9), 3,18 (DP > 12), 3,18 (DP 2- 8) (mmol/g oS), Propionsäure: 0,30 (0), 1,38 (DP Ø 9), 1,35 (DP Ø 9), 1,39 (DP > 12), 1,72 (DP 2- 8) (mmol/g oS), Buttersäure: 0,00 (0), 0,46 (DP Ø 9), 0,51 (DP Ø 9), 0,47 (DP > 12), 0,40 (DP 2- 8) (mmol/g oS), SCFA total: 0,07 (0), 5,06 (DP Ø 9), 5,10 (DP Ø 9), 5,04 (DP > 12), 5,29 (DP 2- 8) (mmol/g oS); Es wurden 2 Inulinprodukte mit DP Ø 9 eingesetzt, die sich in ihrer Löslichkeit unterschieden.	(Vickers <i>et al.</i> 2001)

Inulin-konzentration	Protein-konz. (g/kg TS)	Versuchs-design	Tier-anzahl	Effekt	Referenz
0,00 g/l 1,00 g/l (DP > 20), 1,00 g/l (DP Ø 10-12)	252 <sup>c</sup>	<i>in vitro</i> (24 h)	8	Totale Gasproduktion: 3,06 (0), 4,56 (DP > 20), 3,27 (DP Ø 10- 12) (ml), pH: 6,18 (0), 6,11 (DP > 20), 6,07 (DP Ø 10- 12), Ammoniak: 34,8 (0), 37,2 (DP > 20), 41,7 (DP Ø 10- 12) (mmol/l), SCFA total: 19,8 (0), 23,2 (DP > 20), 15,4 (DP Ø 10- 12) (mmol/l), Colibakterien: 7,77 (0), 7,61 (DP > 20), 7,84 (DP Ø 10- 12) (log KBE/ml), Enterokokken: 8,12 (0), 8,15 (DP > 20), 8,31 (DP Ø 10- 12) (log KBE/ml), Laktobazillen: 7,20 (0), 6,91 (DP > 20), 7,64 (DP Ø 10- 12) (log KBE/ml)	(Biagi <i>et al.</i> 2010)
0,00 % (w/v), 1,00 % (w/v) IPS (89- 94 % I), 1,00 % (w/v) IPX(≥ 75 % I))	200 g/kg uS	<i>in vitro</i> (24 h)	1	Essigsäure: 1,60 (0), 0,81 (IPS), 1,70 (IPX) (mmol/ml), Propionsäure: 0,59 (0), 0,44 (IPS), 1,19 (IPX) (mmol/ml), Buttersäure: 0,40 (0), 0,25 (IPS), 0,34 (IPX) (mmol/ml), <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Parascardovia denticolens</i> : 9,49 (0), 8,27 (IPS), 10,1 (IPX) (log 16S rRNA/ml), Gesamtzahl aller Bakterien: 11,1 (0), 11,1 (IPS), 11,1 (IPX) (log 16S rRNA/ml); Nachweis mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.	(Inness <i>et al.</i> 2011)

Proteinkonz. = Proteinkonzentration der Versuchsdiaät; Kotkonsistenz Punktbewertungsskala: 1 = Diarrhoe, 2 = schlechte Qualität, feucht und schlecht geformt, 3 = gute Qualität, leicht feucht, 4 = gut geformt, leicht aufnehmbar, hinterlässt keine Spuren, 5 = hart, krümlig; I = Inulin; H = Huhn basierte rohe Diät; R = Rind basierte rohe Diät; sV = scheinbare Verdaulichkeit; <sup>2</sup> = Summe aus Phenylethylamin, Putrescin, Cadaverin, Spermidin; <sup>3</sup> = Summe aus Phenol, *p*-Cresol; <sup>c</sup> = Wert von Originalsubstanz auf TS umgerechnet

---

## 2.5 In vitro Dickdarm Digestions- und Fermentationsmodelle

Aufgrund zunehmender Erkenntnisse der vielfältigen Bedeutung der intestinalen Mikrobiota auf die Gesundheit des Wirts und der nicht vorhandenen Zugänglichkeit des Dickdarms für Standarduntersuchungen, haben sich viele *in vitro* Methoden zur Simulation der *in vivo* ablaufenden Verdauungs- und Fermentationsprozesse entwickelt. Die zur Verfügung stehenden *in vitro* Modelle reichen von einfachen, geschlossenen statischen Systemen, ohne Entfernung von Fermentationsprodukten, bis hin zu komplexen, kontinuierlichen Modellen, die darauf ausgelegt sind spezifische Umweltbedingungen des Dickdarms zu simulieren (Macfarlane und Macfarlane 2007). Der Unterschied besteht im Wesentlichen in dem ausbleibenden, periodischen oder fortlaufenden Abgang der Fermentationsprodukte.

Statische Kurzzeitinkubationssysteme, mit einer typischen Inkubationszeit von 24 Stunden, wurden bei mehreren Tierarten eingesetzt und gelten als geeignet um unverdauliche Substrate hinsichtlich ihrer Fermentationskinetik und Endproduktkonzentrationen zu bewerten (Rochus *et al.* 2014). Die Mehrheit der veröffentlichten *in vitro* Fermentationsstudien mit Hunden als Spendertiere, zur Charakterisierung bakterieller Metaboliten, wurde mit statischen Kurzzeitinkubationssystemen durchgeführt (Bosch *et al.* 2013, Calabrò *et al.* 2013, Pinna *et al.* 2016). Aufgrund des geringeren apparativen Aufwands und der geringeren Fehlerquote sowie dem schnelleren Erhalt von Ergebnissen haben sich die statischen Kurzzeitinkubationsmodelle als Methode der Wahl für Routineuntersuchungen von Fermentationsprodukten im Dickdarm herausgestellt (Coles *et al.* 2005). Zudem haben *in vitro* Methoden eine höhere ethische Akzeptanz, da Tierversuche vermieden werden können.

Einschränkungen der *in vitro* Systeme sind das Fehlen des Influx von endogenen Verbindungen, wie Pankreassekret, desquamierte Enterozyten und Mukusprotein, und deren Verdauung sowie Absorption, der Effekt von antinutritiven Faktoren, die fehlende Interaktion zwischen Wirt, aufgenommener Nahrung und Mikrobiota sowie die fehlende Simulation der mukosalen und luminalen bakteriellen Biofilmbildung (Macfarlane und Macfarlane 2007). Dies schließt sie jedoch nicht aus ein wertvolles Forschungsinstrument zu sein (Coles *et al.* 2005). Es existieren zahlreiche Studien zu *in vitro* Untersuchungen der Verdauungs- und Fermentationsvorgänge im Dickdarm mit verschiedenen Monogastriern als Spendern für das Inokulum, jedoch hat sich bis jetzt kein international einheitliches Modell etabliert. Dabei gelten die Konzentration des Inokulums, die Quelle des Inokulums, die Inkubationszeit, das Vorhandensein eines effektiven Puffers, das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der Flüssigkeit und das Substrat als wichtige Einflussfaktoren auf den Ablauf der Fermentation

(Coles *et al.* 2005). Das Inokulum sollte aus Kotproben von gesunden Spendern hergestellt werden, die in den letzten drei Monaten kein Antibiotikum verabreicht bekommen haben. Zudem sollten mindestens von fünf Spendern Kotproben verwendet werden um die interindividuellen Schwankungen größtmöglich zu reduzieren (Edwards *et al.* 1996). Der Einsatz von zusammengefassten Kotproben mehrerer Spender ermöglicht eine weitere Reduktion der interindividuellen Variationen der fäkalen Mikrobiota. Neben der Quelle (Darmdigesta vs. Kot) des Inokulums, hat auch die Fütterung der Spendertiere einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis von *in vitro* Fermentationsstudien (Rochus *et al.* 2014). In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass für die Herstellung des Inokulums für *in vitro* Fermentationsstudien mit Hunden als Spendertiere fäkale Mikrobiota verwendet werden kann. Die maximale Fermentationsrate, bei Ansätzen hergestellt mit einem Inokulum aus Proben vom Rektum und proximalem Kolon, zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die größte Produktion von SCFA lag bei den Fermentationsansätzen mit Proben aus dem Rektum, im Vergleich zu Proben aus dem distalen Ileum, proximalen Kolon und transversalen Kolon, vor (Bosch *et al.* 2008). Ein Verdünnungsverhältnis von 1:10 wurde in den meisten Studien mit Kotproben von Hunden zur Herstellung der Kotsuspension verwendet (Tabelle 5). Als Inkubationszeit wurde in der überwiegenden Anzahl der Studie eine Dauer von 24 Stunden gewählt (Coles *et al.* 2005). Die Zugabe eines effektiven Puffers ist in geschlossenen Fermentationssystemen erforderlich, um einen Abfall des pH-Werts durch die entstehenden SCFA abzufangen. Im Vergleich zur *in vivo* Situation würden die SCFA unmittelbar im Kolon absorbiert werden. In einer Untersuchung zu einem einfachen *in vitro* Fermentationssystem für Polysaccharide wurde festgestellt, dass ein Verhältnis von 1:1 der Oberfläche zum Volumen der Fermentationsflüssigkeit zu einem stärkeren Ablauf der Fermentation geführt hat. Durch die größere Oberfläche konnten gasförmige Fermentationsprodukte an der Flüssigkeits-Gas-Grenze besser austreten. Zudem konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass es bei dem Einsatz von mehr als 10,0 g/l Substrat zu einer Reduktion der Fermentation kommt (Stevenson *et al.* 1997). Da bei Monogastriern erst nach der Passage des oberen Verdauungstrakts die im Chymus enthaltenen Nahrungsbestandteile fermentiert werden, sollte als Substrat vorverdautes Futter oder nur einzelne Substanzen eingesetzt werden (Coles *et al.* 2005).

Tabelle 5: Übersicht zu *in vitro* Fermentationsstudien mit fäkalem Inokulum vom Hund

Anzahl Spender	Inokulum (Verdünnung)	Inkubationszeit Temperatur	Substrat	Effekt	Referenz
3	1:10 (w/v)	6, 12, 24 h 39 °C	Zellulose 310 mg, Haferfaser 310 mg, Rübenschnitzel 310 mg, Reiskleie 310 mg, FOS 310 mg, Laktulose 310 mg, Karayagummi 310 mg, Xanthangummi 310 mg, Talhagummi 310 mg, Johannisbrotkernmehl 310 mg, Johannisbrotmehl 310 mg, Guarkernmehl 310 mg, Zitruspektin 310 mg, Gummi arabicum 310 mg	Ergenbisse nach 24 h Fermentation; Abbaurate oS: Zitruspektin, FOS, Laktulose, Guarkernmehl ↑, Zellulose, Haferfaser, Karayagummi, Xanthangummi, Gummi arabicum ↓, Essigsäure: Zitruspektin ↑, Zellulose, Haferfaser, Karayagummi, Xanthangummi, Gummi arabicum, Reiskleie, Talhagummi ↓, Propionsäure: Johannisbrotmehl, Guarkernmehl, FOS, Laktulose ↑, Zellulose, Haferfaser, Karayagummi, Xanthangummi ↓, Buttersäure: Rübenschnitzel, Talhagummi, Johannisbrotmehl, Zitruspektin, Johannisbrotkernmehl ↑, Zellulose, Haferfaser, Karayagummi, Xanthangummi ↓, SCFA total: Johannisbrotmehl, Guarkernmehl, Zitruspektin, FOS, Laktulose ↑, Zellulose, Haferfaser, Karayagummi, Xanthangummi ↓	(Sunvold <i>et al.</i> 1995c)
6	1:10 (w/v)	6, 12, 24 h 39 °C	Zellulose 310 mg, Rübenschnitzel 310 mg, Gummi arabicum 310 mg, Talhagummi 310 mg, Johannisbrotkernmehl 310 mg, Johannisbrotmehl 310 mg, Zitruspektin 310 mg, Guarkernmehl 310 mg, Zitruspülpe 310 mg, Psylliumgummi 310 mg, Erdnussschalen 310 mg, Sojabohnenhülsen 310 mg	Ergenbisse nach 24 h Fermentation; Abbaurate oS: Zitruspektin, Johannisbrotmehl, Guarkernmehl ↑, Zellulose ↓, SCFA total, Essigsäure: Zitruspülpe, Zitruspektin, Johannisbrotmehl, Guarkernmehl ↑, Zellulose, Erdnussschalen, Talhagummi, Gummi arabicum ↓, Propionsäure: Johannisbrotmehl, Guarkernmehl, Zitruspektin ↑, Zellulose, Erdnussschalen, Talhagummi, Gummi arabicum ↓	(Sunvold <i>et al.</i> 1995b)

Anzahl Spender	Inokulum (Verdünnung)	Inkubationszeit Temperatur	Substrat	Effekt	Referenz
3	1:10	6, 12, 24, 48 h 37 °C	Zellulose 310 mg, Rübenschnitzel 310 mg, Zitruspülpe 310 mg, Zitruspectin 310 mg	Daten zusammengefasst für alle Substrate und Inkubationszeiten: Abbaurrate oS: 36,9 %, Essigsäure: 1,70 (mmol/g oS), Propionsäure: 0,51 (mmol/g oS), Buttersäure: 0,23 (mmol/g oS), SCFA total: 2,44 (mmol/g oS), Laktat: 0,15 (mmol/g oS)	(Sunvold <i>et al.</i> 1995a)
2 6	1:10 (w/v)	24 h 37 °C	<i>Yucca schidigera</i> 0,17 g/l, Aktivkohle 4,43 g/l, Zinkacetat Dihydrat 0,23 g/l; Substrate einzeln und alle 3 zusammen	Gasproduktion total →, Gehalt an Schwefelwasserstoff ↓	(Giffard <i>et al.</i> 2001)
3	1:10 (w/v)	12 h 37°C	Temulose Melasse (Produkt aus Holzchips) 0,20 g, Temulose brauner Zucker 0,20 g, Galactoglucomannan-Oligosaccharide (DP 2- 5) 0,20 g, (DP 6- 8) 0,20 g, (DP 9- 13) 0,20 g, Hefezellwand 0,20 g, Kurzkettiges FOS 0,20 g; alle <i>in vitro</i> vorverdaut	Essigsäure, Propionsäure, SCFA total: Temulose Melasse, Temulose brauner Zucker, Galactoglucomannan-Oligosaccharide (DP 2- 5), (DP 6- 8), (DP 9- 13) ↑, Hefezellwand, kurzkettiges FOS ↓, pH: Hefezellwand ↑, kurzkettiges FOS, Temulose brauner Zucker ↓, <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.: Temulose Melasse ↑, Hefezellwand ↓, <i>C. perfringens</i> : Temulose brauner Zucker ↑, Hefezellwand ↓	(Faber <i>et al.</i> 2011)
3	1:9 (w/v)	72 h 39 °C	FOS 0,50 g, melassierte Zuckerrübenschnitzel 0,50 g, Weizengrieskleie 0,50 g, Geflügelmehl (geringer Aschegehalt) 50 mg, Federmehl 50 mg, Sojabohnenmehl (Lösungsmittel extrahiert) 50 mg	Die Kotproben wurden frisch, nach 30 min bei 5 °C und 24,5 h in zerstoßenem Eis (gekühlt) sowie 30 min -20 °C (gefroren) Lagerung zum Inokulum verarbeitet; Fäzes frisch + gekühlt: Gasproduktion und Bildung von Metaboliten →, Fäzes gefroren: Gasproduktion und Zeitpunkt der maximalen Gasproduktion, Indol, Phenol ↑	(Bosch <i>et al.</i> 2013)

Anzahl Spender	Inokulum (Verdünnung)	Inkubationszeit Temperatur	Substrat	Effekt	Referenz
3	1:9 (w/v)	39 °C 6, 48 h	<i>Hermetia illucens</i> Larvenmehl 0,25 g, <i>Musca domestica</i> Larvenmehl 0,25 g, <i>Tenebrio molitor</i> Larvenmehl 0,25 g, alle Insekten-Substrate <i>in vitro</i> vorverdaut, Schrimpchitin 0,25 g, FOS 0,25 g	Alle Insekten-Substrate und Shrimpchitin zeigten nach 48 h eine vergleichbare Gasproduktion die geringer war im Vergleich zu FOS, Alle Insekten-Substrate: N-acetylglucosamin ↑	(Bosch <i>et al.</i> 2016)
2	1:10 (v/v)	48 h 39 °C	Zellulose 0,50 g, Carboxymethylzellulose 0,50 g, Zuckerrohrfaser 0,50 g, Rübenschnitzel 0,50 g, Weizenkleie 0,50 g, FOS 0,50 g, Inulin 0,50 g, Hefezellwand 0,50 g, Flohsamen 0,50 g, Erbsenhülsen 0,50 g	Maximale Fermentationsrate: Inulin, FOS, Weizenkleie ↑, Zuckerrohrfaser, Carboxymethylzellulose, Zellulose ↓, pH: Zuckerrohrfaser, Carboxymethylzellulose, Zellulose ↑, FOS, Inulin ↓, SCFA total: Inulin, Rübenschnitzel, Flohsamen, Weizenkleie ↑, FOS, Carboxymethylzellulose, Zellulose ↓	(Calabrò <i>et al.</i> 2013)
5	10 g/l	6, 24 h 39 °C	Diät mit 229 g/kg Rp und HD 10 g/l, Diät mit 304 g/kg Rp und HD 10 g/l, Diät mit 303 g/kg Rp und LD 10 g/l, Diät mit 229 g/kg Rp und HD 10 g/l + 1,50 g/l FOS, Diät mit 304 g/kg Rp und HD 10 g/l + 1,50 g/l FOS, Diät mit 303 g/kg Rp und LD 10 g/l + 1,50 g/l FOS; alle Diäten <i>in vitro</i> vorverdaut	Ansätze mit FOS 24 h: pH, Ammoniak ↓, SCFA total, <i>n</i> -Buttersäure, Propionsäure, Putrescin, Spermin ↑, <i>Enterobacteriaceae</i> ↑, <i>Lactobacillus</i> spp. ↓, Ansätze mit Rp 304 und 303 g/kg 24 h: pH, Ammoniak ↑, Spermidin, Spermin ↓, ↑, <i>Lactobacillus</i> spp., Enterokokken ↓, Ansätze mit LD 24 h: pH, Putrescin ↑, Ammoniak, SCFA total, Essigsäure, Propionsäure ↓, <i>C. perfringens</i> ↑	(Pinna <i>et al.</i> 2016)

Anzahl Spender	Inokulum (Verdünnung)	Inkubationszeit Temperatur	Substrat	Effekt	Referenz
5	10 g/l	6, 24 h 39 °C	<i>Yucca schidigera</i> Extrakt 0,10 g/l, Kastanien Tannine 0,30 g/l, Kastanien Tannine 0,30 g/l + <i>Yucca schidigera</i> Extrakt 0,10 g/l	<i>Yucca schidigera</i> Extrakt: Spermin 24 h ↓, <i>i</i> -Buttersäure 6 h ↓, <i>Enterococcus</i> spp. 6 h ↑, <i>Lactobacillus</i> spp. 24 h ↓, Kastanien Tannine: Ammoniak, Essig-, Propion-, <i>i</i> -Buttersäure, SCFA total 6 h ↓, Cadaverin 6 h ↑, Propionsäure, Putrescin, Spermidin, Spermin 24 h ↓, pH 24 h ↑, <i>Escherichia coli</i> 6 h ↓, <i>Yucca schidigera</i> Extrakt + Kastanien Tannine: Cadaverin 6 h ↓	(Pinna <i>et al.</i> 2017)
3	1:10 (w/v)	24 h 39 °C	Zellulose 0,10 g, Sojabohnenhülsen 0,10 g, Sojabohnenhülsen <i>in vitro</i> vorverdaut 0,10 g	Sojabohnenhülsen, Sojabohnenhülsen <i>in vitro</i> vorverdaut: pH, Indol ↓, SCFA total, Laktat, Bifidobakterien ↑	(Myint <i>et al.</i> 2017)

HD = hohe Verdaulichkeit der Diät; LD = geringe Verdaulichkeit der Diät; → = Unverändert; ↓ = Abfall/ Verschlechterung/ niedrigster Gehalt; ↑ = Anstieg/ Verbesserung/ höchster Gehalt

## 2.6 Versuchsziel und Fragestellung

Mit einem steigenden Gehalt an Rohprotein in der Grundration kommt es zu einer Verschiebung der caninen intestinalen Mikrobiota in Richtung von proteolytischen Bakterien. Nach Literaturangaben kommt es insbesondere zu einem vermehrten Wachstum von *Clostridium perfringens*. Damit einher geht die vermehrte Bildung von Abbauprodukten aus der bakteriellen Proteinfermentation im Dickdarm, wie Ammoniak, biogenen Aminen und Phenolverbindungen. Diesen bakteriellen Metaboliten wird eine nachteilige Wirkung auf die Gesundheit zugesprochen. Durch den Zusatz von *Yucca schidigera* soll der gesteigerten Ammoniakbildung entgegengewirkt werden sowie durch den gleichzeitigen Zusatz von Inulin über den bifidogenen Effekt die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren wieder angeregt werden.

Der *in vitro* Fermentationsversuch soll mit den folgenden Zielen durchgeführt werden:

1. Das Fermentationspotenzial von fäkalen Inokula von Hunden, die mit einer proteinarmen oder proteinreichen Diät gefüttert wurden,
2. Effekte von *Yucca schidigera* und Inulin auf die Stoffwechselaktivität der fäkalen caninen Mikrobiota,
3. Effekte von *Yucca schidigera* und Inulin auf die Zusammensetzung der Mikrobiota beim Hund,
4. Eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen dem Rohproteingehalt der aufgenommenen Grundration und der eingesetzten Menge an *Yucca schidigera* und Inulin,
5. Einen synergetischen Effekt von *Yucca schidigera* und Inulin bei der gleichzeitigen Applikation,

zu bewerten.

### 3 Material und Methoden

Der Versuch wurde am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin durchgeführt. Als Versuchsdesign wurde ein statisches Kurzzeitinkubationssystem zur *in vitro* Fermentation gewählt um den Einfluss von *Yucca schidigera* und Inulin, in Verbindung mit einer proteinarmen sowie -reichen Grundration, auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der caninen Mikrobiota zu untersuchen.

#### 3.1 Fütterungsversuch

In einem vorgelagerten Fütterungsversuch wurde an die Spendertiere der Kotproben jeweils über einen definierten Zeitraum eine proteinarme und proteinreiche Versuchsdiät gefüttert, um Kotproben mit einer an den Proteingehalt der Diät angepassten fäkalen Mikrobiota zu gewinnen.

##### 3.1.1 Rohnährstoffbestimmung der Diäten

Mittels Weender Analyse, entsprechend den Empfehlungen der VDLUFA, Methodenbuch II (Naumann und Bassler 2012), wurden die Rohnährstoffgehalte der Versuchsdiäten bestimmt um den Einfluss des Proteingehalts der Grundration quantifizieren zu können. Die Proben zur Untersuchung der Rohnährstoffe stammen aus einer parallel durchgeführten Studie (Tierversuchsantrag G 0228/17).

##### 3.1.2 Tiere

Als Spender zur Herstellung der Kotsuspension für den *in vitro* Versuch fungierten vier adulte Beagle aus dem Institut für Tierernährung. Das Alter der Tiere betrug im Durchschnitt 4,27 ( $\pm$  0,88) Jahre und das Körpergewicht lag bei 12,7 ( $\pm$  2,87) kg. Die Gruppe setzte sich aus drei weiblichen und einem männlichen kastrierten Tier zusammen. Die genaue Zusammensetzung der Versuchstierpopulation ist im Anhang (Tabelle 18) aufgeführt.

### 3.1.3 Haltung

Während der gesamten Fütterungszeit wurden die Tiere in Zweiergruppen in Zwingern mit täglichem Zugang zu einem Auslauf gehalten. Es wurden zwei Versuchsgruppen mit jeweils zwei Hunden gebildet. Die Zuteilung des Futters erfolgte zweimal täglich gemäß festgelegtem Versuchsplan. Die Ration der Versuchsdiät pro Tier pro Tag wurde individuell zur Aufrechterhaltung des Körpergewichts zugeteilt. Jeweils zwei Tiere erhielten die Versuchsdiät A oder B über einen Zeitraum von insgesamt 16 Tagen. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser. Die Diäten waren Teil einer parallel durchgeführten Studie (Eisenhauer 2019), die vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo-Verordnungsnummer: G 0228/17) genehmigt wurde.

#### Versuchsdiäten zur Gewinnung der Kotproben

Versuchsdiät A (proteinarm): Rohprotein 201 g/kg uS

Versuchsdiät B (proteinreich): Rohprotein 377 g/kg uS

### 3.1.4 Probenentnahme

Die Kotproben stammten aus dem Fütterungsversuch einer parallel durchgeführten Studie (Tierversuchsantrag G 0228/17). Am 10., 11., 12. sowie 15. und 16. Tag der Fütterungsphase wurden von jedem Hund Kotproben genommen. Die Proben wurden unmittelbar nach dem Kotabsatz eingesammelt oder rektal entnommen und bei Raumtemperatur luftdicht verschlossen gelagert. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte innerhalb einer Stunde. Zudem wurde von jedem Tier eine Kotprobe zur Analyse der Rohnährstoffe und Charakterisierung der fäkalen Mikrobiota mittels 16S rRNA Sequenzierung verwendet. Bis zur nachfolgenden Sequenzierung wurden die Proben bei -80,0 °C gelagert.

### 3.1.5 Rohnährstoffbestimmung der Kotproben

Die Rohnährstoffgehalte der Kotproben der Spendertiere wurden mittels Weender Analyse, wie bereits bei der Futtermitteluntersuchung beschrieben, analysiert. Die Proben zur

Untersuchung der Rohnährstoffe stammen aus einer parallel durchgeführten Studie (Tierversuchsantrag G 0228/17).

### 3.1.6 Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota der Kotproben

#### DNA-Extraktion aus den Kotproben

Die Extraktion der bakteriellen DNA wurde mit einem kommerziellen Kit (Quiagen® PowerSoil DNA Kit) nach Herstellerangaben durchgeführt, mit Ausnahme der Probengröße. Abweichend von den Herstellerangaben wurden 200 mg anstatt 250 mg Kotprobe in ein PowerBead Tube eingewogen. Im Anschluss wurden die hergestellten Nukleinsäureextrakte bis zur weiteren Analyse bei -20,0 °C aufbewahrt.

#### Prinzip und Durchführung der Illumina®-Sequenzierung

Die gewonnenen DNA-Extrakte wurden von der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) sequenziert. Die Illumina®-Sequenzierung läuft nach dem Prinzip der *de novo*-Synthese ab. Dabei wird die DNA durch mechanische Verfahren fragmentiert und anschließend werden 2 x 300 bp lange „Reads“ sequenziert. Die Analyse wurde mit einem MiSeq-Gerät der Firma Illumina, Inc. (San Diego, Kalifornien, USA) unter der Verwendung der Technologie „Sequencing by Synthesis“ durchgeführt. Die Kotproben zur Untersuchung der fäkalen Mikrobiota stammen aus einer parallel durchgeführten Studie (Tierversuchsantrag G 0228/17). Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in der Dissertation von Eisenhauer 2019.

### 3.2 In vitro Fermentationsmodell (statisches Kurzzeitinkubationssystem)

Im Vorfeld der vorliegenden Studie wurden Versuche durchgeführt, um die Verwendung eines Fermentationsmediums und die Konzentration der Substrate zu betrachten. Dabei stellte sich heraus, dass die Effekte der Substrate auf die Fermentationskinetik des fäkalen Inokulums ohne Zusatz eines Mediums mit einer Protein- und Kohlenhydratquelle besser sichtbar waren. Zudem zeigte sich bei den Dosierungen von 1,00 g/l und 5,00 g/l Inulin der deutlichste Effekt auf die Gesamtkonzentration der SCFA. Bei dem Zusatz von *Yucca schidigera* Pulver waren erst ab dem Zusatz von 1,00 g/l Effekte auf den Gehalt an

---

Ammonium und die Gesamtkonzentration der SCFA sichtbar, sodass abweichend von vorherigen *in vitro* Studien höhere Dosierungen gewählt wurden.

### 3.2.1 Aufbau und Durchführung der *in vitro* Fermentation

Die Herstellung des Inokulums sowie Vorbereitung der Fermentationsansätze erfolgten in einer anaeroben Werkbank. Zunächst wurden neun definierte Substratlösungen von *Yucca schidigera* und Inulin hergestellt. *Yucca schidigera* wurde mit den finalen Konzentrationen von 2,00 g/l und 4,00 g/l in der Fermentationskultur eingesetzt, Inulin in den Konzentrationen 1,00 g/l und 5,00 g/l. Anschließend wurden 3600 µl der Substratlösung in das jeweilige Fermentationsgefäß vorgelegt. Als Fermentationsgefäß wurden Eppendorf Tubes® mit Schraubdeckel und einem Volumen von 5,00 ml verwendet.

Innerhalb einer Stunde nach der Gewinnung der Kotproben erfolgte die Herstellung der Inokula. Dazu wurde 1,00 g von jeder Kotprobe, jeweils separat für die Versuchsdiät A und B, in ein Reagenzgefäß eingewogen. Die gemischte Kotprobe wurde 1:10 mit einem 37,0 °C warmen PRAS-Puffer („Prereduced Anaerobe Sterilized“ Medium nach Holdeman *et al.* 1977) mit Cysteinhydrochlorid als Reduktionsmittel verdünnt. Anschließend wurde die Kotsuspension für eine Minute mit einem Vortexer homogenisiert. Dem schloss sich eine fünf Minuten lange Phase zur Sedimentation der Suspension an.

Zu jedem Inokulum wurden neun Behandlungen angesetzt: (1) Kontrolle ohne Zusatz von Substrat; (2) 2,00 g/l *Yucca schidigera*; (3) 4,00 g/l *Yucca schidigera*; (4) 2,00 g/l *Yucca schidigera* und 1,00 g/l Inulin; (5) 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 1,00 g/l Inulin; (6) 2,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin; (7) 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin; (8) 1,00 g/l Inulin; (9) 5,00 g/l Inulin.

Zu den vorgelegten Substratlösungen wurden 400 µl der entsprechenden Kotsuspension von Versuchsdiät A oder B in das jeweilige Fermentationsgefäß pipettiert. Die Fermentationsgefäße wurden fest verschlossen. Jeweils 16 Fermentationsgefäße wurden in einen Ständer mit einer Neigung von etwa 45° zusammen mit einem anaeroben Gas produzierenden Beutel in eine 2,30 l Kunststoffbox mit Clip-Verschluss und Silikondichtung gestellt. Die Boxen mit den Fermentationsansätzen wurden aus der anaeroben Werkbank ausgeschleust und zum Schutz vor Lichteinstrahlung in Alufolie eingewickelt. Unmittelbar anschließend erfolgte die Inkubation für 24 Stunden bei 37,0 °C unter anaeroben Bedingungen und 370 Umdrehungen pro Minute in einem Schüttelinkubator.

Eine Wiederholung der Fermentation wurde an insgesamt fünf Tagen durchgeführt. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 19) aufgelistet.

Verwendete Lösungen

PRAS-Puffer (g/l aqua bidestillata)

Cysteinhydrochlorid 5,00  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat) 0,50  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Di-Kaliumhydrogenphosphat) 0,50  
NaHCO<sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat) 5,00  
NaCl (Natriumchlorid) 1,00  
CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Kalziumchlorid-Dihydrat) 0,1324  
MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (Magnesiumsulfat-Heptahydrat) 0,10  
Resazurin 0,001

Substratlösung 1: Kontrolle

PRAS-Puffer 50,0 ml

Substratlösung 2: 2,00 g/l *Yucca schidigera*

*Yucca schidigera* Pulver 0,111 g  
PRAS-Puffer 50,0 ml

Substratlösung 3: 4,00 g/l *Yucca schidigera*

*Yucca schidigera* Pulver 0,222 g  
PRAS-Puffer 50,0 ml

Substratlösung 4: 2,00 g/l *Yucca schidigera* und 1,00 g/l Inulin

*Yucca schidigera* Pulver 0,111 g  
Inulin 0,0555 g  
PRAS-Puffer 50,0 ml

Substratlösung 5: 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 1,00 g/l Inulin

*Yucca schidigera* Pulver 0,222 g  
Inulin 0,0555 g  
PRAS-Puffer 50,0 ml

Substratlösung 6: 2,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin

*Yucca schidigera* Pulver 0,111 g

Inulin 0,2775 g

PRAS-Puffer 50,0 ml

Substratlösung 7: 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin

*Yucca schidigera* Pulver 0,222 g

Inulin 0,2775 g

PRAS-Puffer 50,0 ml

Substratlösung 8: 1,00 g/l Inulin

Inulin 0,0555 g

PRAS-Puffer 50,0 ml

Substratlösung 9: 5,00 g/l Inulin

Inulin 0,2775 g

PRAS-Puffer 50,0 ml

### 3.2.2 Probengewinnung und Präparation

Die Fermentation wurde nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden durch sofortiges Überführen der Gefäße in ein Eisbad gestoppt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit wurden die Fermentationsansätze bei Raumtemperatur für zehn Minuten und 21.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die nachfolgenden Untersuchungen der bakteriellen Metabolite aliquotiert und in neue Eppendorfgefäße überführt. Das Zentrifugat wurde mit 500 µl RNAlater resuspendiert und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die gewonnenen Proben wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -20,0 °C eingefroren.

### 3.3 Analyse bakterieller Metaboliten der fäkalen Mikrobiota

#### 3.3.1 Bestimmung des pH-Werts

##### Methode

Der pH-Wert wurde mit einer Micro-pH-Elektrode gemessen.

##### Durchführung

Zur Bestimmung des pH-Werts wurde bei Raumtemperatur die Micro-pH-Elektrode in den Überstand der Fermentationslösung eingetaucht und anschließend der Messwert erfasst. Die Elektrode wurde zuvor mit einer Zwei-Punktkalibrierung mit den Standardlösungen pH 4,00 und pH 7,00 kalibriert. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 20) aufgelistet.

#### 3.3.2 Bestimmung von Ammonium

##### Methode

Der Gehalt an Ammonium wurde mit Hilfe der Berthelot-Reaktion und anschließender photometrischer Konzentrationsmessung quantitativ bestimmt. Die Reaktion läuft im basischen Milieu (pH = 13,0) ab, in dem Ammonium als Ammoniak vorliegt. Im Rahmen der Berthelot-Reaktion reagiert Ammoniak mit Hypochlorit und Thymol über vier Reaktionsschritte zu Indolphenol. Im basischen Milieu zeigt das Indolphenolmolekül eine Blaufärbung, die zur Konzentrationsmessung durch Extinktion mit Hilfe eines Photometers genutzt wird.

##### Durchführung

Für die photometrische Bestimmung wurde der Überstand der Fermentationslösung um den Faktor 1:30 sowie 1:35 (v/v) mit MOPS-Lösung (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure) (pH 7,00) verdünnt. Einzelne Proben wurden aufgrund zu hoher Extinktionswerte 1:40 oder 1:45 (v/v) verdünnt. 20,0 µl des verdünnten Probenüberstands wurden mit 100 µl Phenol-Nitroprussid-Lösung und 100 µl 0,20 % Natriumhypochloritlösung zum Ablauf der Berthelot-Reaktion in einer 96-Well Mikrotiterplatte gemischt. Im Anschluss wurde der Ansatz für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Messung der Probe im Photometer bei 620 nm. Die Konzentration wurde anhand einer Kalibrierreihe bestimmt. Die zweite Messung

der Proben erfolgte nach weiteren fünf Minuten Inkubationszeit. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 21) aufgelistet.

#### Verwendete Lösungen

##### Verdünnungsmedium: 100 mmol MOPS-Lösung

MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure) 2,09 g

Reinstwasser 100 ml

##### Standardstammlösung: 1000 µmol Ammoniumchlorid-Lösung

100 mmol Ammoniumchlorid-Lösung 535 mg

100 mmol MOPS-Lösung 10,0 ml

Zum Erhalt einer 1.000 µmol Endkonzentration folgte eine zweimalige 1:10 Verdünnung.

### 3.3.3 Bestimmung von SCFA und BCFA

#### Methode

Der Gehalt an kurzkettigen und verzweigt-kettigen Fettsäuren wurde mit Hilfe der Gaschromatografie mit Flammenionisationsdetektor analysiert.

#### Durchführung

Es wurden 100 µl des Überstands der Fermentationslösung mit 900 µl Probenverdünnungslösung B mit 0,50 mmol/l Capronsäure als internem Standard in ein Vial pipettiert und anschließend zehn Sekunden mittels Vortexer gemischt. Als externer Standard wurde eine Mischung kurzkettiger Fettsäuren (Lösung C) verwendet. Es folgte die Analyse im Gaschromatografen, wobei zur chromatografischen Trennung eine Polyethylenglycol Säule genutzt wurde und Wasserstoff als Trägergas. Das Injektionsvolumen betrug 1,00 µl und die Flussrate vom Wasserstoff 20,0 ml/min. Die Bestimmung des Gehalts der kurzkettigen Fettsäuren erfolgte durch die Flächenintegration der Chromatogramme unter Verwendung der Software HP ChemStation. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 22) aufgelistet.

### Gemessene Verbindungen

SCFA: Essigsäure, Propionsäure, *n*-Buttersäure, *n*-Valeriansäure

BCFA: *i*-Buttersäure, *i*-Valeriansäure

### Verwendete Lösungen

#### Lösung A: Stammlösung 10,0 mmol/l

*n*-Hexansäure 250 µl

Oxalsäure-Dihydrat 2,00 g

Reinstwasser ad 200 ml

#### Lösung B: Probenverdünnungslösung 0,50 mmol/l

Stammlösung 50,0 ml

Oxalsäure-Dihydrat 10,0 g

Reinstwasser ad 1000 ml

#### Lösung C: Standardlösung 0,50 mmol/l kurzkettige Fettsäuren

SULPECO Stammlösung 10,0 mmol/l 50,0 µl

Oxalsäure-Dihydrat 10,0 mg

Reinstwasser 950 µl

### 3.3.4 Bestimmung von D- und L-Laktat

#### Methode

Der Gehalt an D- und L-Laktat wurde mittels Flüssigchromatografie bestimmt.

#### Durchführung

Die Proben wurden zunächst für fünf Minuten im Ultraschallbad mit 36,0 kHz und Raumtemperatur aufbereitet. 500 µl des Überstands der Fermentationslösung wurden mit 500 µl 0,50 mmol/l Kupfer-II-sulfat-Lösung (Lösung B) vermischt. Danach wurden je 100 µl Carrezlösung I und Carrez II (Lösung C und D) nacheinander zugegeben um die Proteinfällung zu erzielen. Nach jeder Zugabe folgte ein Mischen der Proben mittels Vortexer. Im Anschluss folgte die Zentrifugation bei 9,00 °C und 21.100 x g für zehn Minuten. Der Probenüberstand wurde durch einen Zellulose-Acetatfilter (0,45 µm) in ein frisches

---

Eppendorfgesäß überführt. 250 µL des filtrierten Überstands wurden in ein Messgefäß gefüllt. Es folgte die Analyse, bei der die Proben mit 2,50 mmol/l Kupfer-II-sulfat-Lösung mit 2-Propanol (Lösung A) und Kupfer-II-sulfat-Lösung 0,50 mM eluiert und anschließend photometrisch bei 253 nm detektiert wurden. Die Bestimmung des Gehalts an D- und L-Laktat resultierte aus der Flächenintegrierung der Chromatogramme mit der Chromeleon-Software 6.9. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 23) aufgelistet.

#### Gemessene Verbindungen

D-Laktat, L-Laktat

#### Verwendete Lösungen

##### Lösung A: 2,50 mmol Kupfer-II-sulfat-Lösung mit 2-Propanol

Kupfer-II-sulfat 399 mg

2-Propanol 50,0 ml

Reinstwasser ad 1000 ml

##### Lösung B: 0,50 mmol Kupfer-II-sulfat-Lösung

Kupfer-II-sulfat 79,8 mg

Reinstwasser ad 1000 ml

##### Lösung C: Carrez I

Zinkchlorid 17,0 g

Reinstwasser 100 ml

##### Lösung D: Carrez II

Kaliumhexacyanoferrat (II) 15,0 g

Reinstwasser 100 ml

### 3.3.5 Bestimmung von biogenen Aminen

#### Methode

Der Gehalt an biogenen Aminen wurde mittels Ionenaustauscherchromatografie bestimmt.

### Durchführung

500 µl des Überstands der Fermentationslösung wurden mit 1,00 ml Extraktionslösung (Lösung A) mit 0,50 mmol Hexamethylenaminedihydrochlorid als interner Standard vermischt. Es folgte für 30 Minuten eine Aufbereitung im Schüttler bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben bei 9,00 °C und 21.100 x g für zehn Minuten zentrifugiert. 700 µl des Probenüberstands wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 700 µl Extraktionslösung gemischt. Über einen Zellulose-Acetatfilter-Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm) wurde die verdünnte Probe in ein Messgefäß gefüllt. Es folgte die Analyse, bei der die Proben mit Natriumhydrolysatpuffer (pH 5,00) und einem Polyaminpuffer eluiert wurden und anschließend mit Ninhydrinreagenz photometrisch bei 570 nm detektiert wurden. Die Bestimmung des Gehalts an biogenen Aminen erfolgte durch Integrierung der Flächen der Chromatogramme durch die Software EZChrom Elite 3.3.2. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 24) aufgelistet.

### Gemessene Verbindungen

Putrescin, Cadaverin, Histamin, Spermidin, Spermin

### Verwendete Lösungen

#### Lösung A: Extraktionslösung

Trichloressigsäure 100 g

Thiodipropionsäure 2,00 g

Hexamethylenaminedihydrochlorid 0,50 mmol/l

Reinstwasser ad 1000 ml

### 3.3.6 Bestimmung von Phenol- und Indolverbindungen

#### Methode

Der Gehalt an Phenol- und Indolverbindungen wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatografie bestimmt.

#### Durchführung

Für die Bestimmung der Phenolverbindungen wurden 500 µl des Überstands der Fermentationslösung mit 500 µl Salzsäure versetzt und für 60 Minuten bei 100 °C im

Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 500 µl des Hydrolysats mit 500 µl Methanol in ein Messgefäß pipetiert und gemischt. Zur Bestimmung der Indolverbindungen wurden 500 µl des Überstands der Fermentationslösung, ohne vorherige Aufbereitung, in ein Messgefäß pipetiert. Als externer Standard wurde eine Mischung aus Phenol- und Indolverbindungen in Form einer Drei-Punktkalibrierung mit den Lösungen A, B, C verwendet. Es folgte die Analyse, bei der die Proben mit Acetonitril, versetzt mit 0,10 % Phosphorsäure, und Acetonitril allein, im Verhältnis 80:20 eluiert wurden und nachfolgend photometrisch bei einer Emission von 305 nm und Extinktion von 260 nm detektiert wurden. Die Bestimmung des Gehalts an Phenol- und Indolverbindungen erfolgte durch Integrierung der Flächen der Chromatogramme durch die Chromeleon-Software 6.9. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 25) aufgelistet.

#### Gemessene Verbindungen

Phenol, *p*-Cresol (4-Methylphenol), 4-Ethylphenol  
Indol, 3-Methylindol (Skatol)

#### Verwendete Lösungen

##### Lösung A: Externe Standardlösung geringe Konzentration von Phenol- und Indolverbindungen

Phenol 12,868 µg/ml  
*p*-Cresol 12,58 µg/ml  
4-Ethylphenol 12,156 µg/ml  
Indol 5,94 µg/ml  
3-Methylindol 14,608 µg/ml

##### Lösung B: Externe Standardlösung mittlere Konzentration von Phenol- und Indolverbindungen

Phenol 25,736 µg/ml  
*p*-Cresol 25,16 µg/ml  
4-Ethylphenol 24,312 µg/ml  
Indol 11,8 µg/ml  
3-Methylindol 29,216 µg/ml

Lösung C: Externe Standardlösung hohe Konzentration von Phenol- und Indolverbindungen

Phenol 128,68 µg/ml

*p*-Cresol 125,80 µg/ml

4-Ethylphenol 121,56 µg/ml

Indol 59,4 µg/ml

3-Methylindol 146,08 µg/ml

3.4 Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota des Fermentationszentrifugats

Die Extraktion der DNA erfolgte aus dem Zentrifugat der einzelnen Fermentationsansätze. Die dsDNA-Konzentrationsbestimmung sowie die qPCR wurden mit den zuvor hergestellten DNA-Extrakten durchgeführt.

3.4.1 DNA-Extraktion aus dem Fermentationszentrifugat

Durchführung

Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und für drei Minuten bei 21.191 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in 100 µl RNAlater resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterienzellen zur Gewinnung der dsDNA erfolgte durch „Bead Beating“ und Hitze. Dazu wurde die Bakteriensuspension in ein FastPrep Tube Matrix E überführt. 500 µl Puffer RA 1 sowie 5,00 µl 2-Mercaptoethanol wurden hinzugefügt und mit einem Vortexer gemischt. Der Ansatz wurde für zehn Minuten bei 90,0 °C inkubiert. Für den weiteren Aufschluss wurden die Proben bei 6 m/s für 40 Sekunden homogenisiert. Das Lysat wurde für drei Minuten bei 19.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Trennung der DNA und RNA in ein NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Column transferiert und für eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Silica-Membran wurde in ein neues Auffanggefäß überführt und mit je 500 µl DNA Wash gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 11.000 x g. Die Aufbereitung der Proben mit DNA Wash wurde zweimal aufeinanderfolgend durchgeführt. Anschließend wurde die Silica-Membran in ein Probengefäß gesetzt und zum Trocknen für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µl DNA Elute wurden hinzugefügt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Gewinnung der Extrakte wurden die Proben für eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. Bis zur Durchführung der qPCR erfolgte eine Lagerung der DNA-

Extrakte bei -30,0 °C. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 26) aufgelistet.

### 3.4.2 Bestimmung der dsDNA-Konzentration der Extrakte

#### Methode

Der Gehalt an dsDNA der Extrakte wurde fluorometrisch bestimmt.

#### Durchführung

Die Quantifizierung erfolgt unter Verwendung des Kits Promega QuantiFluor® dsDNA System E2670 mit modifiziertem Protokoll anhand einer Standardreihe. Zunächst wurde dazu ein 1 x TE Buffer, die Arbeitslösung 1 x Dye, bestehend aus QuantiFluor® dsDNA Dye 1:400 in 1 x TE Buffer verdünnt, sowie eine Standardreihe aus Kalbsthymus-DNA von 0,40 bis 12,0 ng/µl hergestellt. 20,0 µl der DNA-Extrakte wurden mit jeweils 200 µl 1 x Dye in einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte gemischt. Es folgte die Messung der Probe im Fluorospektrometer bei einer Exzitation von 506 nm und 535 nm Emission. Die Konzentration wurde anhand der Standardreihe bestimmt. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 27) aufgelistet.

### 3.4.3 Prinzip und Durchführung der qPCR

#### Methode

Im Rahmen der qPCR wurden festgelegte 16S DNA-Sequenzen der zu identifizierenden Bakterien durch spezifische Primer (Tabelle 6) quantitativ und qualitativ nachgewiesen. Ein qualitativer Nachweis erfolgte durch die Bildung spezifischer Amplifikationsprodukte der definierten 16S DNA-Sequenzen. Der quantitative Nachweis erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Brilliant II SYBR® Green, der sich in die dsDNA einlagert und bei Anregung Licht emittiert. Aufgrund der Echtzeitverfolgung jedes einzelnen Zyklus der PCR kann ein cT-Wert (concentration threshold) bestimmt werden, der direkt mit der Menge der eingesetzten Ziel-DNA korreliert. PCR Produkte der zu identifizierenden Bakterien mit bekannter Kopienzahl/ng DNA werden als Quantifizierungsstandard genutzt, anhand derer die Kopienzahl der Bakterien/ µl Extrakt ermittelt wurde.

Durchführung

Für die qPCR wurden 1,00 µl DNA Extrakt und 24,0 µl Reaktionslösung (Tabelle 7) in ein PCR-Gefäß pipettiert. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen für die einzelnen qPCR-Analysen sind in Tabelle 8 aufgelistet. Bei jeder Analyse wurden zu Beginn eine Aktivierung und anschließend 40 Zyklen durchlaufen. Jeder Zyklus bestand aus den aufeinander folgenden Phasen der Denaturierung, Annealing der Primer und Elongation der DNA-Fragmente. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Differenzierung von spezifisch und unspezifisch gebildeten PCR-Produkten oder Primer-Dimeren durchgeführt. Die Auswertung der qPCR erfolgte unter Verwendung der Software MxPro QPCR. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (Tabelle 28) aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Primer für die qPCR

Spezifität	Primername	Primersequenz (5' → 3')	Produkt- größe (bp)	Referenz
<i>Lactobacillus</i> spp.	LAC-1	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA	341	(Rinttilä <i>et al.</i> 2004)
	LAC-2	R: CACCGCTACACATGGAG		
<i>Bifidobacterium</i> spp.	g-BIFID-F	F: TCGCGTCYGGTGTGAAAG	243	(Rinttilä <i>et al.</i> 2004)
	g-BIFID-R	R: CCACATCCAGCRTCCAC		
Enterobakterien	EntqPCR3417f	F: GTBTCDCCRCGCAGRC	435	Ti
	EntqPCR3852r	R: TGCGYCTGGTRATCTA		
<i>E. coli/ Hafnia/ Shigella</i> Cluster	Entero-F	F: GTTAATACCTTTGCTCATTGA	340	(Malinen <i>et al.</i> 2003)
	Entero-R	R: ACCAGGGTATCTAATCCTGTT		
<i>Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas</i> Cluster	BPP1	F: GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT	140	(Rinttilä <i>et al.</i> 2004)
	BPP2	R: CGGAYGTAAGGGCCGTGC		
Clostridien Cluster I	CI-F1	F: TACCHRAGGAGGAAGCCAC	231	(Song <i>et al.</i> 2004)
	CI-R2	R: GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT		
<i>Clostridium perfringens</i>	Cpa-1-f	F: TGACACAGGGGAATCACAAA	120	Ti
	Cpa-1-r	R: CGCTATCAACGGCAGTAACA		
<i>Clostridium leptum</i> Cluster (Cluster IV)	sg-Clept-F	F: GCACAAGCAGTGGAGT	239	(Matsuki <i>et al.</i> 2004)
	sg-Clept-R	R: CTCCTCCGTTTTGTCAA		
<i>Clostridium coccooides</i> Cluster (Cluster XIVa)	g-Ccoc-F	F: AAATGACGGTACCTGACTAA	440	(Matsuki <i>et al.</i> 2004)
	g-Ccoc-R	R: CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA		

Ti = Eigenherstellung vom Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin

Tabelle 7: Reaktionslösungen für die qPCR

Reagenzien	Primerkonzentration 0,20 µM	Primerkonzentration 0,40 µM	Primerkonzentration 0,60 µM
Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR MasterMix	675 µl	675 µl	675 µl
Forward Primer (10 µM)	27,0 µl	54,0 µl	81,0 µl
Reverse Primer (10 µM)	27,0 µl	54,0 µl	81,0 µl
RNase freies Wasser	567 µl	513 µl	459 µl

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der qPCR

	Aktivierung	Denaturierung	Annealing der Primer	Elongation der DNA- Fragmente	Primerkon- zentration
<i>Lactobacillus</i> spp.	95 °C/15 min	95 °C/30 sec	58 °C/30 sec	72 °C/30 sec	0,40 µM
<i>Bifidobacterium</i> spp.	95 °C/15 min	95 °C/30 sec	58 °C/30 sec	72 °C/30 sec	0,40 µM
Enterobakterien	95 °C/15 min	95 °C/30 sec	55 °C/30 sec	72 °C/30 sec	0,60 µM
<i>E. coli/ Hafnia/ Shigella</i> Cluster	95 °C/15 min	95 °C/30 sec	55 °C/30 sec	72 °C/30 sec	0,40 µM
<i>Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas</i> Cluster	95 °C/15 min	95 °C/30 sec	55 °C/30 sec	72 °C/30 sec	0,40 µM
Clostridien Cluster I	95 °C/15 min	95 °C/30 sec	63 °C/30 sec	72 °C/30 sec	0,40 µM
<i>Clostridium leptum</i> Cluster (Cluster IV)	95 °C/15 min	95 °C/30 sec	60 °C/30 sec	72 °C/30 sec	0,60 µM
<i>Clostridium coccooides</i> Cluster (Cluster XIVa)	95 °C/15 min	95 °C/30 sec	60 °C/30 sec	72 °C/30 sec	0,40 µM
<i>Clostridium perfringens</i>	95 °C/15 min	95 °C/30 sec	55 °C/30 sec	72 °C/30 sec	0,20 µM

### 3.5 Statistische Auswertung

#### Durchführung

Die Auswertung wurde mit IBM SPSS Statistics 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Daten der analysierten Werte für SCFA, deren molaren Verhältnisse, Ammonium, dem Quotienten von Ammonium und SCFA insgesamt und dem pH-Wert werden als arithmetisches Mittel mit der Standardabweichung für jede der neun Substratlösungen, die für Diät A und B an den fünf Replikationstagen inkubiert wurden, dargestellt. Für D- und L-Laktat, Phenol, Indol und Putrescin sowie der qPCR wurden, aufgrund der zuvor beobachteten Effekte bei den SCFA, nur die Kontrollansätze, 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 5,00 g/l Inulin sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 5,00 g/l Inulin für Diät A

und B ausgewertet. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der jeweiligen Substratlösungen wurden durch eine einfaktorielle Varianzanalyse mit der Substratlösung als festen Faktor getestet, wobei der Tukey-Test als Post-Hoc-Test (ANOVA Tukey PostHoc) angewendet wurde.

Um die Haupteffekte der Substratlösungen zu analysieren, wurden die Daten von Diät A und B für jede Substratlösung zusammengefasst und als arithmetisches Mittel mit dem Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Fermentationsansätzen wurden in einer dreifaktoriellen Analyse mit dem Allgemeinen Linearen Modell (GLM), in dem "Diät", "*Yucca schidigera*" und "Inulin" als feste Faktoren verwendet wurden, untersucht. Das Signifikanzniveau war  $\alpha = 0,05$ , und  $\alpha \leq 0,10$  wurde als Trend angenommen.

Die Daten der Kotproben zu den Rohnährstoffen und der fäkalen Mikrobiota wurden für jeden Spender einzeln und mit dem arithmetischen Mittelwert für Diät A und B sowie dem Standardfehler des Mittelwerts angezeigt.

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Rohnährstoffanalyse

Die Ergebnisse der Rohnährstoffanalyse der Diäten und Kotproben waren Teil einer parallel durchgeführten Studie (Eisenhauer 2019).

#### 4.1.1 Nährstoffgehalte der Diäten

Im Fütterungsversuch wurden zwei verschiedene Alleinfuttermittel als Diäten eingesetzt. Die Zusammensetzung der Futtermittel basierte auf einer einheitlichen Grundmischung. Bei der proteinarmen Diät A wurde der Anteil des tierischen Proteins durch eine Erhöhung des Gehalts an Reismehl reduziert. Die proteinarme Diät A enthielt insgesamt 173 g/kg Fleisch und tierische Nebenerzeugnisse in Form von Geflügel-, Grieben- und Knochenmehl. Der Anteil an Fleisch und tierischen Nebenerzeugnissen der proteinreichen Diät B betrug 409 g/kg. Die Rohproteinkonzentrationen lagen bei 201 g/kg uS und 377 g/kg uS. Die Zusammensetzung der Diäten und die Ergebnisse der Futtermitteluntersuchung sind in Tabelle 29 dargestellt.

#### 4.1.2 Nährstoffgehalte der Kotproben

Die Rohnährstoffe der Kotproben der einzelnen Tiere zeigten ähnliche Werte, wobei die Proben der Spender, die mit der proteinreichen Diät B gefüttert wurden, einen um 93,0 g/kg TS höheren Rohproteingehalt zeigten (Tabelle 30).

### 4.2 Bakterielle Metaboliten der fäkalen Mikrobiota

Die *in vitro* mikrobiellen Fermentationsprofile wurden durch beide Faktoren, die Ernährung der Spendertiere und die getesteten Substrate, signifikant verändert (Tabelle 9; Tabelle 10; Tabelle 12; Tabelle 14). Insgesamt führte die Fütterung der proteinarmen Diät zu einer

erhöhten mikrobiellen Fermentationsintensität und die Zugabe von Inulin hatte eine deutlichere Wirkung als das *Yucca schidigera* Pulver sowie die Kombinationen aus beiden.

### 4.2.1 Ergebnisse der Bestimmung des pH-Werts

In Tabelle 12 sind die mittleren pH-Werte der Fermentationsansätze nach einer Inkubation von 24 Stunden aufgelistet. Der Fermentationsansatz mit dem Zusatz von 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin bei proteinarmer Fütterung zeigte den niedrigsten pH-Wert. Der höchste pH-Wert lag bei dem Kontrollansatz für die proteinreiche Fütterung vor.

Die Verwendung des fäkalen Inokulums der proteinreich gefütterten Hunde ( $p \leq 0,001$ ) ergab einen Anstieg des pH-Werts. Diese Veränderungen zeigten sich in Verbindung mit den Unterschieden in der Produktion der SCFA. Durch die Zugabe von Inulin ( $p \leq 0,001$ ) wurde eine deutliche Senkung des pH-Werts ermittelt, die durch die Kombination mit *Yucca schidigera* weiter numerisch reduziert wurde (Tabelle 13).

Für den pH-Wert zeigten sich Effekte bei den Einflussfaktoren Proteingehalt der Diät der Spendertiere sowie dem Zusatz von Inulin.

### 4.2.2 Ergebnisse der Bestimmung von Ammonium

Tabelle 12 zeigt die mittleren Ammoniumwerte der Fermentationsansätze nach einer Inkubation von 24 Stunden. Der niedrigste Gehalt an Ammonium lag bei dem Fermentationsansatz mit 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin bei proteinreicher Fütterung vor. Der Kontrollansatz bei proteinarmer Fütterung resultierte in der höchsten Ammoniumkonzentration.

Die Verwendung des fäkalen Inokulums der proteinreich gefütterten Hunde ( $p \leq 0,001$ ), die Zugabe von Inulin ( $p \leq 0,001$ ) sowie tendenziell die Kombination von Inulin und der proteinreichen Fütterung ( $p = 0,092$ ) ergab eine Verringerung der Ammoniumkonzentration. Der Zusatz von *Yucca schidigera* allein hatte im Vergleich zu den Kontrollansätzen nur einen geringen Einfluss (Tabelle 13).

Um die Bildung von Ammonium und SCFA im Verhältnis zueinander betrachten zu können, wurde der Quotient aus Ammonium und der Gesamtkonzentration der SCFA gebildet. In Tabelle 12 sind die Quotienten der Fermentationsansätze nach einer Inkubation von 24 Stunden aufgelistet. Der Fermentationsansatz 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 5,00 g/l Inulin

bei proteinarmer Fütterung zeigte den niedrigsten Quotienten. Der höchste Quotient lag bei dem Kontrollansatz für die proteinreiche Fütterung vor.

Die Fermentationsansätze mit fäkalem Inokulum der proteinarm gefütterten Hunde ( $p = 0,003$ ), die Zugabe von Inulin ( $p \leq 0,001$ ) sowie die Kombination von Inulin und der proteinarmen Fütterung ( $p = 0,006$ ) zeigten eine Verringerung des Quotienten. Zudem konnte nach der Supplementierung von *Yucca schidigera* ( $p = 0,016$ ) und der Kombination von Inulin mit *Yucca schidigera* ( $p = 0,031$ ) eine Reduktion des Quotienten festgestellt werden (Tabelle 13).

Für den Gehalt an Ammonium sowie den Quotienten aus Ammoniak und SCFA zeigten sich Effekte bei den Einflussfaktoren Proteingehalt der Diät der Spendertiere, dem Zusatz von Inulin und der Kombination von Inulin mit Proteingehalt. Für den Quotienten zeigte sich zusätzlich durch die Supplementierung von *Yucca schidigera* und die Kombination von beiden Substraten ein Einfluss auf die Fermentationskinetik.

#### 4.2.3 Ergebnisse der Bestimmung von SCFA und BCFA

Die mittleren Werte für kurz- und verzweigtkettige Fettsäuren sowie deren molare Verhältnisse der Fermentationsansätze nach einer Inkubation von 24 Stunden sind in Tabelle 9 und 10 dargestellt.

Die niedrigste Gesamtkonzentration an SCFA lag bei dem Kontrollansatz der proteinreichen Fütterung vor. Die größte Gesamtmenge an SCFA wurde bei dem Fermentationsansatz mit 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin bei proteinarmer Fütterung festgestellt.

Durch die Verwendung des fäkalen Inokulums der proteinreich gefütterten Hunde ( $p \leq 0,001$ ) zeigte sich ein geringerer Gesamtgehalt an SCFA, im Vergleich zu den Ansätzen mit fäkalem Inokulum der proteinarm gefütterten Hunde. Mit diesem Einfluss der proteinreichen Diät stand eine Reduktion der Konzentration von Essigsäure, Propionsäure ( $p \leq 0,001$ ) und *i*-Valeriansäure ( $p = 0,003$ ) in Zusammenhang. *n*-Valeriansäure und *i*- sowie *n*-Buttersäure zeigten keine Veränderungen. Die relative molare Konzentration von *n*-Buttersäure ( $p = 0,047$ ) zeigte bei der proteinreichen Diät der Spendertiere einen niedrigeren Anteil. Die Zugabe von Inulin führte zu einer Steigerung der Gesamtkonzentration der SCFA ( $p \leq 0,001$ ). Dieser Effekt spiegelte sich in einem Anstieg der Konzentration von Essigsäure, Propionsäure und *n*-Buttersäure ( $p \leq 0,001$ ) wider. *i*-Valeriansäure war bei Zusatz von Inulin reduziert ( $p \leq 0,001$ ). Die relativen molaren Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren zeigten ein entsprechendes Bild. Bei der Kombination von Inulin mit der proteinarmen

Fütterung lag eine weitere Steigerung des Gehalts von Propionsäure ( $p = 0,030$ ) und deren relativen molaren Konzentration ( $p = 0,008$ ) vor. Inulin in Verbindung mit der proteinreichen Fütterung zeigte eine Reduktion des Gehalts von *i*-Valeriansäure ( $p = 0,014$ ) und einen Anstieg der relativen molaren Konzentration von *n*-Buttersäure ( $p = 0,082$ ). Durch den Zusatz von *Yucca schidigera* allein ( $p = 0,012$ ) und die Kombination von *Yucca schidigera* und Inulin ( $p = 0,053$ ) ergab sich eine Reduktion der relativen molaren Konzentration von *i*-Valeriansäure (Tabelle 11).

Die Einflussfaktoren Proteingehalt der Diät der Spendertiere sowie der Zusatz von Inulin zeigten auf den Gesamtgehalt an SCFA, die absoluten Konzentrationen sowie relativen molaren Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren, eine Wirkung. Die Supplementierung von *Yucca schidigera* hatte nur einen untergeordneten Effekt.

#### 4.2.4 Ergebnisse der Bestimmung von D- und L-Laktat

In Tabelle 14 sind die mittleren Werte von D- und L-Laktat der Fermentationsansätze nach einer Inkubation von 24 Stunden aufgelistet. Der Kontrollansatz für die proteinreiche Fütterung zeigte den niedrigsten Wert für D- und L-Laktat. Die höchste Konzentration von D- und L-Laktat lag bei dem Fermentationsansatz mit 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin bei proteinarmer Fütterung vor.

Die Verwendung des fäkalen Inokulums der proteinreich gefütterten Hunde ( $p = 0,041$ ) ergab eine verminderte D-Laktatkonzentration. Durch den Zusatz von Inulin zeigte sich ein Anstieg der Konzentrationen von D- und L-Laktat ( $p \leq 0,001$ ). Bei der Kombination von Inulin mit der proteinarmen Fütterung ( $p = 0,068$ ) lag eine weitere Steigerung des Gehalts von D-Laktat vor (Tabelle 15).

Für D- und L-Laktat zeigten sich Effekte durch den Einflussfaktor Zusatz von Inulin sowie für D-Laktat zusätzlich durch den Proteingehalt der Diät der Spendertiere.

#### 4.2.5 Ergebnisse der Bestimmung von biogenen Aminen

Das einzig nachweisbare biogene Amin in den Fermentationsansätzen war Putrescin. Tabelle 14 zeigt die mittleren Konzentrationen von Putrescin der Fermentationsansätze nach einer Inkubation von 24 Stunden. Der niedrigste Gehalt an Putrescin lag bei dem

---

Kontrollansatz bei proteinreicher Fütterung vor. Insgesamt zeigten die verschiedenen Fermentationsansätze sehr ähnliche Konzentrationen.

Die Zugabe von Inulin ( $p \leq 0,001$ ) resultierte in einer Steigerung der Konzentration von Putrescin (Tabelle 15).

Als relevanter Einflussfaktor auf die Konzentration von Putrescin konnte der Zusatz von Inulin festgestellt werden.

#### 4.2.6 Ergebnisse der Bestimmung von Phenol- und Indolverbindungen

Tabelle 14 zeigt die mittleren Phenol- und Indolkonzentrationen der Fermentationsansätze nach einer Inkubation von 24 Stunden. Die Gehalte an 4-Methylphenol, 4-Ethylphenol sowie 3-Methylindol befanden sich unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze.

Der niedrigste Gehalt an Phenol lag bei dem Fermentationsansatz mit 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin bei proteinreicher Fütterung vor. Der Fermentationsansatz mit 4,00 g/l *Yucca schidigera* bei proteinreicher Fütterung beinhaltete die höchste Konzentration an Phenol.

Es wurden keine signifikanten Veränderungen in der Konzentration von Phenol festgestellt (Tabelle 15).

Die geringste Indolkonzentration wurde in dem Fermentationsansatz mit 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin bei proteinreicher Fütterung nachgewiesen. Die höchste Konzentration von Indol lag bei dem Kontrollansatz der proteinarmen Fütterung vor.

Durch die Verwendung des fäkalen Inokulums der proteinreich gefütterten Hunde ( $p = 0,003$ ), die Zugabe von Inulin ( $p \leq 0,001$ ) sowie die Kombination von Inulin und der proteinreichen Fütterung ( $p = 0,010$ ) ergab sich eine Verringerung der Indolkonzentration (Tabelle 15).

Die Einflussfaktoren Proteingehalt der Diät der Spendertiere sowie der Zusatz von Inulin zeigten auf den Gehalt von Indol eine Wirkung.

Tabelle 9: Mittlere Gehalte von SCFA im Fermentationsüberstand nach 24 h *in vitro* Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden

	Diät A (proteinarm)									Diät B (proteinreich)									
	0	2 YSP	4 YSP	1 I	5 I	2 YSP		4 YSP		0	2 YSP	4 YSP	1 I	5 I	2 YSP		4 YSP		
						+ 1 I	+ 5 I	+ 1 I	+ 5 I						+ 1 I	+ 5 I			
( $\mu\text{mol/ml}$ )																			
Essig- säure	cde 6,87 ± 3,40	bcde 7,84 ± 4,38	abcde 8,15 ± 2,26	abcd 9,64 ± 2,35	abc 12,5 ± 3,56	abcd 10,2 ± 2,53	ab 13,4 ± 2,69	abcd 10,0 ± 1,50	a 14,0 ± 2,61	e 3,11 ± 2,23	e 3,66 ± 2,28	de 5,34 ± 2,68	de 5,84 ± 2,19	abcde 8,32 ± 2,24	de 6,26 ± 1,83	abcd 10,4 ± 2,12	de 6,24 ± 1,28	abcd 10,0 ± 1,87	
Propion- säure	d 1,30 ± 1,60	d 0,82 ± 0,29	d 0,95 ± 0,17	abcd 1,97 ± 0,65	abc 3,43 ± 1,70	abcd 2,18 ± 0,71	a 3,75 ± 1,81	abcd 2,13 ± 0,34	ab 3,66 ± 1,66	d 0,26 ± 0,09	d 0,42 ± 0,14	d 0,66 ± 0,28	d 1,27 ± 0,21	bcd 1,68 ± 0,55	cd 1,44 ± 0,26	abcd 2,05 ± 0,74	cd 1,45 ± 0,13	abcd 1,98 ± 0,66	
<i>i</i> -Butter- säure	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,21 ± 0,44	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	
<i>n</i> -Butter- säure	abc 0,94 ± 0,52	abc 1,10 ± 0,57	abc 1,23 ± 0,31	abc 1,87 ± 0,38	abc 2,78 ± 1,04	abc 2,05 ± 0,40	abc 2,84 ± 0,93	abc 2,09 ± 0,53	abc 3,10 ± 1,32	c 0,30 ± 0,27	bc 0,49 ± 0,30	abc 0,79 ± 0,35	abc 1,90 ± 1,36	abc 2,79 ± 2,29	abc 2,09 ± 1,26	a 3,47 ± 2,48	abc 1,98 ± 1,12	ab 3,23 ± 2,64	
<i>i</i> -Valerian- säure	a 0,03 ± 0,02	a 0,03 ± 0,01	ab 0,03 ± 0,01	ab 0,02 ± 0,01	b 0,01 ± 0,01	ab 0,01 ± 0,01	ab 0,01 ± 0,01	ab 0,01 ± 0,01	b 0,00 ± 0,01	ab 0,02 ± 0,01	ab 0,01 ± 0,01	ab 0,01 ± 0,01	ab 0,01 ± 0,01	ab 0,01 ± 0,01	b 0,00 ± 0,01	ab 0,01 ± 0,02	b 0,01 ± 0,01	b 0,00 ± 0,01	
<i>n</i> -Valerian- säure	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,50 ± 1,01	0,06 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,07	0,14 ± 0,13	0,11 ± 0,08	0,15 ± 0,16	0,11 ± 0,06	0,15 ± 0,17	
Σ SCFA <sup>■</sup>	cde 9,18 ± 5,17	bcde 9,83 ± 5,22	bcde 10,4 ± 2,63	abcd 13,6 ± 3,12	ab 18,8 ± 6,12	abc 14,5 ± 3,33	a 20,1 ± 5,16	abc 14,8 ± 2,01	a 20,8 ± 5,02	e 3,72 ± 2,60	de 4,61 ± 2,73	cde 6,85 ± 3,30	cde 9,12 ± 3,72	abcde 13,1 ± 4,98	bcde 9,91 ± 3,33	abc 16,1 ± 5,05	bcde 9,81 ± 2,40	abc 15,4 ± 5,22	
Σ BCFA <sup>□</sup>	0,05 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,21 ± 0,44	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	

Mittelwerte dargestellt mit ihrer Standardabweichung; YSP = *Yucca schidigera* Pulver; I = Inulin; <sup>■</sup>Σ SCFA = Summe von kurzkettigen Fettsäuren Essigsäure, Propionsäure, *i*-Buttersäure, *n*-Buttersäure, *i*-Valeriansäure, *n*-Valeriansäure; <sup>□</sup>Σ BCFA = Summe von verzweigtkettigen Fettsäuren *i*-Buttersäure und *i*-Valeriansäure; <sup>a-e</sup>Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Reihe bedeuten signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) ANOVA Tukey PostHoc

Tabelle 10: Mittlere molare Verhältnisse von SCFA im Fermentationsüberstand nach 24 h *in vitro* Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden

	Diät A (proteinarm)										Diät B (proteinreich)									
	0	2 YSP	4 YSP	1 I	5 I	2 YSP + 1 I	2 YSP + 5 I	4 YSP + 1 I	4 YSP + 5 I		0	2 YSP	4 YSP	1 I	5 I	2 YSP + 1 I	2 YSP + 5 I	4 YSP + 1 I	4 YSP + 5 I	
(mol %)																				
Essig-säure	abcde 76,8 ± 6,97	ab 78,6 ± 3,02	abc 77,8 ± 2,75	abcde 70,9 ± 1,53	bcde 67,5 ± 3,99	abcde 69,9 ± 2,16	bcde 67,7 ± 4,77	bcde 67,8 ± 3,55	bcde 68,0 ± 5,48		a 82,3 ± 2,76	abcd 77,3 ± 4,69	abcde 76,9 ± 2,60	cde 64,7 ± 2,90	bcde 65,8 ± 8,93	e 64,0 ± 4,14	bcde 67,3 ± 11,9	de 64,5 ± 5,51	bcde 68,0 ± 11,6	
Propion-säure	abc 12,0 ± 7,62	c 9,07 ± 2,00	bc 9,39 ± 1,43	abc 14,3 ± 2,19	ab 17,5 ± 3,41	abc 14,9 ± 2,14	a 17,9 ± 4,31	abc 14,5 ± 1,93	abc 17,0 ± 4,01		abc 9,65 ± 5,03	abc 11,0 ± 4,27	abc 10,4 ± 2,18	abc 15,4 ± 5,32	abc 13,0 ± 1,18	abc 15,4 ± 3,98	abc 12,5 ± 1,62	abc 15,6 ± 3,99	abc 12,9 ± 1,09	
<i>i</i> -Butter-säure	0,33 ± 0,20	0,33 ± 0,10	0,24 ± 0,06	0,15 ± 0,04	0,06 ± 0,05	0,14 ± 0,04	0,07 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,06 ± 0,04		0,40 ± 0,30	0,31 ± 0,07	0,22 ± 0,04	0,16 ± 0,03	1,93 ± 4,11	0,15 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,08 ± 0,03	
<i>n</i> -Butter-säure	10,3 ± 2,12	11,4 ± 1,74	12,0 ± 2,01	14,3 ± 3,13	14,6 ± 2,64	14,6 ± 3,26	14,0 ± 2,81	14,3 ± 3,68	14,6 ± 4,88		7,01 ± 2,37	10,6 ± 1,21	11,8 ± 1,43	18,8 ± 6,95	18,3 ± 10,6	19,4 ± 6,77	19,3 ± 10,3	18,7 ± 8,58	18,3 ± 10,6	
<i>i</i> -Valerian-säure	a 0,40 ± 0,21	ab 0,34 ± 0,12	abc 0,27 ± 0,10	bc 0,11 ± 0,07	c 0,02 ± 0,04	bc 0,09 ± 0,07	c 0,04 ± 0,05	c 0,06 ± 0,06	c 0,01 ± 0,03		a 0,44 ± 0,29	abc 0,25 ± 0,14	bc 0,13 ± 0,12	c 0,06 ± 0,08	c 0,05 ± 0,07	c 0,04 ± 0,06	c 0,05 ± 0,09	c 0,04 ± 0,06	c 0,02 ± 0,03	
<i>n</i> -Valerian-säure	0,20 ± 0,34	0,27 ± 0,35	0,29 ± 0,32	0,36 ± 0,26	0,25 ± 0,06	0,38 ± 0,24	0,25 ± 0,05	3,25 ± 6,36	0,27 ± 0,04		0,18 ± 0,17	0,59 ± 0,44	0,55 ± 0,23	0,94 ± 0,36	0,86 ± 0,67	1,05 ± 0,44	0,79 ± 0,71	1,09 ± 0,47	0,77 ± 0,76	

Mittelwerte dargestellt mit ihrer Standardabweichung; YSP = *Yucca schidigera* Pulver; I = Inulin; <sup>a-e</sup>Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Reihe bedeuten signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) ANOVA Tukey PostHoc

Tabelle 11: Mittlere Gehalte von SCFA sowie deren molare Verhältnisse im Fermentationsüberstand nach 24 h *in vitro* Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin; zusammengefasst als arithmetisches Mittel der Messwerte von Diät A und B (n = 10)

	Substratlösung, (g/l)										<i>p</i> -Wert*						
	0	2 YSP	4 YSP	1 I		2 YSP		4 YSP		SEM <sup>§</sup>	Diät	YSP	I	YSP × Diät	I × Diät	YSP × I	Diät × YSP × I
				5 I	+ 1 I	+ 5 I	+ 1 I	+ 5 I									
(μmol/ml)																	
Essigsäure	4,99	5,75	6,75	7,74	10,4	8,22	11,9	8,12	12,0	0,84	≤ 0,001	0,157	≤ 0,001	0,948	0,983	0,874	0,963
Propionsäure	0,78	0,62	0,81	1,62	2,55	1,81	2,90	1,79	2,82	0,29	≤ 0,001	0,771	≤ 0,001	0,812	<b>0,030</b>	0,928	0,958
<i>i</i> -Buttersäure	0,02	0,02	0,02	0,02	0,11	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,460	0,393	0,521	0,369	0,277	0,417	0,420
<i>n</i> -Buttersäure	0,62	0,79	1,01	1,89	2,78	2,07	3,15	2,03	3,16	0,33	0,684	0,612	≤ 0,001	0,943	0,437	0,995	0,991
<i>i</i> -Valeriansäure	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	<b>0,003</b>	0,370	≤ 0,001	0,914	<b>0,014</b>	0,946	0,977
<i>n</i> -Valeriansäure	0,01	0,02	0,03	0,07	0,09	0,08	0,10	0,31	0,10	0,03	0,947	0,306	0,118	0,408	0,349	0,464	0,458
Σ SCFA <sup>■</sup>	6,45	7,22	8,63	11,3	16,0	12,2	18,1	12,3	18,1	1,47	≤ 0,001	0,246	≤ 0,001	0,952	0,986	0,955	0,975
Σ BCFA <sup>□</sup>	0,04	0,04	0,04	0,03	0,12	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,679	0,362	0,649	0,372	0,184	0,480	0,446
(mol %)																	
Essigsäure	79,6	78,0	77,4	67,8	66,7	67,0	67,5	66,1	68,0	1,88	0,197	0,853	≤ 0,001	0,836	0,107	0,891	0,683
Propionsäure	10,8	10,0	9,88	14,8	15,3	15,2	15,2	15,0	14,9	0,81	0,126	0,932	≤ 0,001	0,793	<b>0,008</b>	0,987	0,809
<i>i</i> -Buttersäure	0,36	0,32	0,23	0,16	1,00	0,14	0,08	0,14	0,07	0,10	0,288	0,297	0,634	0,340	0,360	0,468	0,441
<i>n</i> -Buttersäure	8,66	11,0	11,9	16,5	16,5	17,0	16,7	16,5	16,5	1,06	<b>0,047</b>	0,728	≤ 0,001	0,886	0,082	0,892	0,990
<i>i</i> -Valeriansäure	0,42	0,29	0,20	0,09	0,03	0,06	0,05	0,05	0,02	0,05	0,233	<b>0,012</b>	≤ 0,001	0,580	0,361	0,053	0,631
<i>n</i> -Valeriansäure	0,19	0,43	0,42	0,65	0,55	0,72	0,52	2,17	0,52	0,19	0,661	0,318	0,100	0,418	0,568	0,425	0,458

YSP = *Yucca schidigera* Pulver; I = Inulin; <sup>§</sup>SEM = Standardfehler des Mittelwerts; <sup>\*</sup>*p*-Wert = Wahrscheinlichkeit von Diät- und Substratwirkungen, bestimmt durch das Allgemeine Lineare Modell; <sup>■</sup>Σ SCFA = Gesamtkonzentration SCFA, Summe von Essigsäure, Propionsäure, *i*-Buttersäure, *n*-Buttersäure, *i*-Valeriansäure, *n*-Valeriansäure; <sup>□</sup>Σ BCFA = Gesamtkonzentration BCFA, Summe von *i*-Buttersäure und *i*-Valeriansäure

Tabelle 12: Mittlerer pH-Wert, Gehalt von Ammonium und der Quotient aus Ammonium und Gesamtkonzentration SCFA im Fermentationsüberstand nach 24 h *in vitro* Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden

	Diät A (proteinarm)									Diät B (proteinreich)								
	0	2 YSP	4 YSP	1 I	5 I	2 YSP + 1 I	2 YSP + 5 I	4 YSP + 1 I	4 YSP + 5 I	0	2 YSP	4 YSP	1 I	5 I	2 YSP + 1 I	2 YSP + 5 I	4 YSP + 1 I	4 YSP + 5 I
pH	7,07 ± 0,48	7,23 ± 0,16	7,17 ± 0,17	6,88 ± 0,09	5,69 ± 0,35	6,81 ± 0,09	5,49 ± 0,29	6,73 ± 0,08	5,44 ± 0,24	7,43 ± 0,17	7,36 ± 0,12	7,26 ± 0,13	6,96 ± 0,10	5,97 ± 0,29	6,94 ± 0,05	6,00 ± 0,32	7,01 ± 0,15	5,82 ± 0,30
(mmol/ml) NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	12,8 ± 4,72	11,5 ± 3,85	11,1 ± 2,97	10,0 ± 2,68	7,16 ± 1,04	10,4 ± 2,23	6,37 ± 1,05	9,99 ± 2,26	6,17 ± 1,32	8,72 ± 2,50	8,37 ± 2,43	8,24 ± 2,03	7,95 ± 2,34	6,22 ± 1,92	7,86 ± 2,29	5,87 ± 1,45	8,00 ± 1,98	5,80 ± 1,56
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / Σ SCFA <sup>◇</sup>	1,58 ± 0,44	1,32 ± 0,45	1,09 ± 0,21	0,76 ± 0,18	0,40 ± 0,09	0,74 ± 0,16	0,33 ± 0,06	0,68 ± 0,11	0,30 ± 0,05	3,45 ± 2,37	2,19 ± 0,84	1,43 ± 0,59	0,90 ± 0,13	0,49 ± 0,10	0,81 ± 0,12	0,38 ± 0,11	0,82 ± 0,07	0,39 ± 0,07

Mittelwerte dargestellt mit ihrer Standardabweichung; YSP = *Yucca schidigera* Pulver; I = Inulin; <sup>◇</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ Σ SCFA = Quotient aus Ammonium und Gesamtkonzentration SCFA; <sup>a-f</sup> Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Reihe bedeuten signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) ANOVA Tukey PostHoc

Tabelle 13: Mittlerer pH-Wert, Gehalt von Ammonium und der Quotient aus Ammonium und Gesamtkonzentration SCFA im Fermentationsüberstand nach 24 h *in vitro* Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin und den Kombinationen aus 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 1,00 sowie 5,00 g/l Inulin; zusammengefasst als arithmetisches Mittel der Messwerte von Diät A und B (n = 10)

	Substratlösung, (g/l)										p-Wert*						
	0	2 YSP	4 YSP	1 I	5 I	2 YSP + 1 I	2 YSP + 5 I	4 YSP + 1 I	4 YSP + 5 I	SEM <sup>§</sup>	Diät	YSP	I	YSP × Diät	I × Diät	YSP × I	Diät × YSP × I
pH (mmol/ml)	7,25	7,30	7,22	6,92	5,83	6,87	5,75	6,87	5,63	0,23	≤ 0,001	0,255	≤ 0,001	0,988	0,123	0,715	0,370
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10,8	9,94	9,68	8,98	6,69	9,14	6,12	8,99	5,99	0,59	≤ 0,001	0,625	≤ 0,001	0,884	0,092	0,956	0,992
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / Σ SCFA <sup>◇</sup>	2,51	1,76	1,26	0,83	0,45	0,78	0,35	0,75	0,34	0,24	0,003	0,016	≤ 0,001	0,279	0,006	0,031	0,304

YSP = *Yucca schidigera* Pulver; I = Inulin; <sup>§</sup>SEM = Standardfehler des Mittelwerts; \*p-Wert = Wahrscheinlichkeit von Diät- und Substratwirkungen, bestimmt durch das Allgemeine Lineare Modell; <sup>◇</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ Σ SCFA = Quotient aus Ammonium und Gesamtkonzentration SCFA

Tabelle 14: Mittlere Gehalte bakterieller Metaboliten im Fermentationsüberstand nach 24 h *in vitro* Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 5,00 g/l Inulin und der Kombination aus 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden

	Diät A (proteinarm)				Diät B (proteinreich)			
	0	4 YSP	5 I	4 YSP + 5 I	0	4 YSP	5 I	4 YSP + 5 I
D-Laktat (µmol/ml)	0,07 <sup>b</sup> ± 0,05	0,17 <sup>b</sup> ± 0,07	3,81 <sup>a</sup> ± 0,93	4,65 <sup>a</sup> ± 1,78	0,03 <sup>b</sup> ± 0,03	0,09 <sup>b</sup> ± 0,04	3,34 <sup>a</sup> ± 0,90	3,11 <sup>a</sup> ± 0,33
L-Laktat (µmol/ml)	0,05 <sup>b</sup> ± 0,02	0,15 <sup>b</sup> ± 0,04	3,52 <sup>a</sup> ± 0,90	3,76 <sup>a</sup> ± 1,21	0,04 <sup>b</sup> ± 0,03	0,12 <sup>b</sup> ± 0,04	3,23 <sup>a</sup> ± 1,46	2,66 <sup>a</sup> ± 1,19
Phenol (µg/ml)	1,20 ± 0,39	1,04 ± 0,14	1,05 ± 0,31	1,06 ± 0,35	1,27 ± 0,61	1,32 ± 0,49	1,22 ± 0,40	0,98 ± 0,36
Indol (µg/ml)	6,65 <sup>a</sup> ± 4,26	4,84 <sup>ab</sup> ± 3,48	0,51 <sup>bc</sup> ± 0,82	0,29 <sup>c</sup> ± 0,37	1,83 <sup>bc</sup> ± 2,01	1,63 <sup>bc</sup> ± 1,27	0,10 <sup>c</sup> ± 0,23	0,05 <sup>c</sup> ± 0,12
Putrescin (µmol/ml)	0,11 <sup>bc</sup> ± 0,01	0,11 <sup>bc</sup> ± 0,01	0,12 <sup>abc</sup> ± 0,01	0,12 <sup>ab</sup> ± 0,01	0,10 <sup>c</sup> ± 0,01	0,11 <sup>bc</sup> ± 0,01	0,12 <sup>ab</sup> ± 0,01	0,12 <sup>a</sup> ± 0,01

Mittelwerte dargestellt mit ihrer Standardabweichung; YSP = *Yucca schidigera* Pulver; I = Inulin; <sup>a-c</sup>Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Reihe bedeuten signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) ANOVA Tukey PostHoc

Tabelle 15: Mittlere Gehalte bakterieller Metaboliten im Fermentationsüberstand nach 24 h *in vitro* Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 5,00 g/l Inulin und der Kombination aus 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 5,00 g/l Inulin; zusammengefasst als arithmetisches Mittel der Messwerte von Diät A und B (n = 10)

	Substratlösung, (g/l)					<i>p</i> -Wert*						
	0	4 YSP	5 I	4 YSP + 5 I	SEM <sup>§</sup>	Diät	YSP	I	YSP × Diät	I × Diät	YSP × I	Diät × YSP × I
D-Laktat (µmol/ml)	0,05	0,13	3,57	3,88	1,05	<b>0,041</b>	0,453	≤ <b>0,001</b>	0,274	0,068	0,652	0,310
L-Laktat (µmol/ml)	0,05	0,14	3,37	3,21	0,92	0,193	0,884	≤ <b>0,001</b>	0,447	0,217	0,637	0,476
Phenol (µg/ml)	1,24	1,18	1,13	1,02	0,05	0,385	0,504	0,315	0,938	0,629	0,827	0,385
Indol (µg/ml)	4,24	3,23	0,31	0,17	1,03	<b>0,003</b>	0,403	≤ <b>0,001</b>	0,512	<b>0,010</b>	0,524	0,600
Putrescin (µmol/ml)	0,09	0,11	0,12	0,12	0,01	0,580	0,322	≤ <b>0,001</b>	0,740	0,103	0,912	0,740

YSP = *Yucca schidigera* Pulver; I = Inulin; <sup>§</sup>SEM = Standardfehler des Mittelwerts; \**p*-Wert = Wahrscheinlichkeit von Diät- und Substratwirkungen, bestimmt durch das Allgemeine Lineare Modell

---

### 4.3 Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota

#### 4.3.1 Ergebnisse der Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota der Kotproben

Die Ergebnisse der DNA-Extraktion aus den Kotproben waren Teil einer parallel durchgeführten Studie (Eisenhauer 2019), die vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo-Verordnungsnummer: G 0228/17) genehmigt wurde.

Die Ernährung der Spendertiere hatte einen Einfluss auf die phylogenetische Struktur des fäkalen Mikrobioms. Die Kotproben der Hunde, die mit der proteinarmen Diät gefüttert wurden, zeigten eine geringere Häufigkeit von *Eubacterium* spp. und ein höheres Vorkommen von *Hespellia* spp. im Vergleich zu den Proben der Hunde, die mit der proteinreichen Diät gefüttert wurden. Kotproben von Hunden, die proteinreiche Diät erhielten, hatten einen geringeren Anteil an *Clostridium* spp. und *Robinsoniella* spp.. Im Vergleich zum proteinarm gefütterten Hund Nummer 1 zeigten beide proteinreich gefütterten Hunde einen niedrigeren *Lactobacillus* spp. und einen höheren *Blautia* spp. Gehalt (Tabelle 31).

#### 4.3.2 Ergebnisse der Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota des Fermentationszentrifugats

In Tabelle 16 sind die mittleren Gehalte an Bakterien sowie die relativen Verhältnisse einzelner Bakterien im jeweiligen Cluster der Fermentationsansätze nach einer Inkubation von 24 Stunden aufgelistet.

Analog zu den Ergebnissen der Gesamtkonzentration an SCFA lag die niedrigste Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen bei dem Kontrollansatz der proteinreichen Fütterung vor. Die größte Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen wurde bei den Fermentationsansätzen mit 5,00 g/l Inulin allein sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera* und 5,00 g/l Inulin bei proteinarmer Fütterung festgestellt.

Durch die Verwendung des fäkalen Inokulums der proteinreich gefütterten Hunde ( $p \leq 0,001$ ) zeigte sich eine geringere Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen im Vergleich zu den Ansätzen mit fäkalem Inokulum der proteinarm gefütterten Hunde. Mit diesem Einfluss der proteinreichen Diät stand eine Reduktion der Anzahl an 16S rDNA Kopien von Clostridien Cluster XIVa, Clostridien Cluster IV, Clostridien Cluster I, *Clostridium perfringens* sowie dessen Verhältnis innerhalb des Clostridien Cluster I, *Escherichia/ Hafnia/ Shigella* Cluster und dessen Verhältnis innerhalb der Gesamt Enterobakterien ( $p \leq 0,001$ ), *Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas* Cluster sowie *Lactobacillus* spp. ( $p = 0,001$ ) in Verbindung.

Keinen Einfluss hatte der Proteingehalt der Diät auf *Bifidobacterium* spp. und die Gesamt Enterobakterien.

Die Zugabe von *Yucca schidigera* führte zu einer Steigerung der Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen ( $p = 0,021$ ). Dieser Effekt spiegelte sich in einem Anstieg der Anzahl an 16S rDNA Kopien von Clostridien Cluster XIVa ( $p = 0,002$ ), Clostridien Cluster Cluster IV ( $p = 0,010$ ), *Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas* Cluster ( $p = 0,005$ ), *Escherichia/ Hafnia/ Shigella* Cluster ( $p \leq 0,001$ ) und dessen Verhältnis innerhalb der Gesamt Enterobakterien ( $p = 0,053$ ) sowie einer Reduktion des Verhältnisses von *Clostridium perfringens* innerhalb des Clostridien Cluster I ( $p = 0,019$ ), wider. Bei der Kombination von *Yucca schidigera* mit der proteinarmen Diät lag bei dem *Escherichia/ Hafnia/ Shigella* Cluster ( $p = 0,053$ ) eine Steigerung der Kopienzahl vor. Bei dem Verhältnis von *Clostridium perfringens* innerhalb des Clostridien Cluster I zeigte sich bei der Kombination von *Yucca schidigera* mit der proteinreichen Diät eine Reduktion ( $p = 0,098$ ).

Durch die Supplementierung von Inulin zeigte sich eine Steigerung der Gesamtkopienzahl aller bakterieller Gruppen ( $p \leq 0,001$ ). In diesem Zusammenhang wurde eine vermehrte Anzahl an 16S rDNA Kopien bei Clostridien Cluster XIVa, Clostridien Cluster IV, *Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas* Cluster, *Bifidobacterium* spp., *Escherichia/ Hafnia/ Shigella* Cluster ( $p \leq 0,001$ ) sowie Gesamt Enterobakterien ( $p = 0,038$ ) analysiert. Die Kombination von Inulin mit der proteinarmen Fütterung ergab einen Anstieg der Kopienzahl bei Clostridien Cluster Cluster XIVa ( $p = 0,080$ ), *Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas* Cluster ( $p = 0,072$ ) sowie *Escherichia/ Hafnia/ Shigella* Cluster ( $p = 0,044$ ).

Bei der Kombination von *Yucca schidigera* und Inulin konnte ein höherer Gehalt an 16S rDNA Kopien bei Clostridien Cluster XIVa ( $p = 0,053$ ) festgestellt werden (Tabelle 17).

Die Einflussfaktoren Proteingehalt der Diät der Spendertiere, der Zusatz von Inulin und *Yucca schidigera* allein und die Kombination von Inulin mit der proteinarmen Diät zeigten auf die Gesamtkopienzahl aller bakterieller Gruppen sowie einzelnen Bakteriengruppen einen Einfluss. Die Supplementierung von *Yucca schidigera* in Kombination mit dem Proteingehalt der Diät und die Kombination beider Substrate miteinander hatten nur einen untergeordneten Effekt.

Tabelle 16: Mittlere Gehalte an Bakterien (dargestellt als log 16S rDNA Kopien/ ml) sowie die relativen Verhältnisse einzelner Bakterien im Cluster im Fermentationszentrifugat nach 24 h *in vitro* Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 5,00 g/l Inulin und der Kombination aus 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 5,00 g/l Inulin mit fäkalen Inokula von proteinarm (Diät A; n = 5) und proteinreich (Diät B; n = 5) gefütterten Hunden

	Diät A (proteinarm)				Diät B (proteinreich)			
	0	4 YSP	5 I	4 YSP + 5 I	0	4 YSP	5 I	4 YSP + 5 I
<i>Clostridium coccooides</i> Cluster (Cluster XIVa)	10,7 <sup>bc</sup> ± 0,45	11,0 <sup>abc</sup> ± 0,47	11,4 <sup>ab</sup> ± 0,22	11,5 <sup>a</sup> ± 0,21	9,68 <sup>d</sup> ± 0,50	10,6 <sup>c</sup> ± 0,29	11,0 <sup>abc</sup> ± 0,47	11,3 <sup>abc</sup> ± 0,28
<i>Clostridium leptum</i> Cluster (Cluster IV)	10,4 <sup>abc</sup> ± 0,29	10,6 <sup>ab</sup> ± 0,40	11,0 <sup>a</sup> ± 0,26	11,0 <sup>a</sup> ± 0,10	9,27 <sup>d</sup> ± 0,32	9,94 <sup>dc</sup> ± 0,28	10,2 <sup>bc</sup> ± 0,42	10,5 <sup>abc</sup> ± 0,42
Clostridien Cluster I	9,74 <sup>a</sup> ± 0,39	9,82 <sup>a</sup> ± 0,46	9,81 <sup>a</sup> ± 0,34	9,81 <sup>a</sup> ± 0,28	8,77 <sup>b</sup> ± 0,45	9,01 <sup>ab</sup> ± 0,43	9,10 <sup>ab</sup> ± 0,56	9,25 <sup>ab</sup> ± 0,42
<i>Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas</i> Cluster	9,68 <sup>b</sup> ± 0,42	9,93 <sup>ab</sup> ± 0,53	10,4 <sup>a</sup> ± 0,18	10,5 <sup>a</sup> ± 0,10	8,93 <sup>c</sup> ± 0,42	9,56 <sup>bc</sup> ± 0,34	10,1 <sup>ab</sup> ± 0,14	10,4 <sup>a</sup> ± 0,10
<i>Lactobacillus</i> spp.	9,90 ± 0,19	9,78 ± 0,28	9,51 ± 0,18	9,53 ± 0,31	9,29 ± 0,44	9,26 ± 0,23	9,16 ± 0,57	9,28 ± 0,50
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9,76 ± 0,28	9,70 ± 0,29	10,3 ± 0,21	10,3 ± 0,34	9,78 ± 0,19	9,69 ± 0,22	10,1 ± 0,66	10,2 ± 0,52
<i>Clostridium perfringens</i>	8,60 ± 0,55	8,31 ± 0,78	8,48 ± 0,56	8,39 ± 0,46	4,32 ± 3,95	4,21 ± 3,85	5,71 ± 3,20	4,24 ± 3,89
<i>Escherichia/ Hafnia/ Shigella</i> Cluster	10,1 <sup>bcd</sup> ± 0,21	10,3 <sup>abc</sup> ± 0,32	10,4 <sup>ab</sup> ± 0,29	10,6 <sup>a</sup> ± 0,20	9,21 <sup>e</sup> ± 0,16	9,80 <sup>d</sup> ± 0,09	9,94 <sup>cd</sup> ± 0,13	10,3 <sup>abc</sup> ± 0,09
Gesamt Enterobakterien <sup>5</sup>	10,3 ± 0,20	10,5 ± 0,33	10,9 ± 0,28	10,9 ± 0,20	8,18 ± 4,57	10,2 ± 0,29	11,0 ± 0,36	10,9 ± 0,29

	Diät A (proteinarm)				Diät B (proteinreich)			
	0	4 YSP	5 I	4 YSP + 5 I	0	4 YSP	5 I	4 YSP + 5 I
Verhältnis <i>Escherichia</i> Cluster innerhalb der Gesamt Enterobakterien (%)	63,3 <sup>ab</sup> ± 32,9	72,9 <sup>a</sup> ± 29,4	48,5 <sup>ab</sup> ± 35,4	59,8 <sup>ab</sup> ± 37,0	8,84 <sup>b</sup> ± 4,97	43,1 <sup>ab</sup> ± 27,3	13,7 <sup>b</sup> ± 14,8	29,6 <sup>ab</sup> ± 26,9
Verhältnis <i>C. perfringens</i> innerhalb Clostridien Cluster I (%)	7,75 <sup>a</sup> ± 2,68	3,82 <sup>bcd</sup> ± 2,34	5,36 <sup>ab</sup> ± 2,83	4,34 <sup>abc</sup> ± 2,38	1,07 <sup>cd</sup> ± 1,23	0,36 <sup>d</sup> ± 0,33	0,51 <sup>cd</sup> ± 0,32	0,31 <sup>d</sup> ± 0,39
Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen	11,2 <sup>bc</sup> ± 0,28	11,4 <sup>abc</sup> ± 0,40	11,8 <sup>a</sup> ± 0,15	11,8 <sup>a</sup> ± 0,13	10,5 <sup>d</sup> ± 0,37	10,9 <sup>cd</sup> ± 0,23	11,4 <sup>abc</sup> ± 0,37	11,6 <sup>ab</sup> ± 0,25

Mittelwerte dargestellt mit ihrer Standardabweichung; YSP = *Yucca schidigera* Pulver; I = Inulin; <sup>a-e</sup>Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Reihe bedeuten signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) ANOVA Tukey PostHoc; <sup>5</sup> = normalisiert auf mittlere 16S rDNA Kopien pro Genom (6) bei Enterobakterien

Tabelle 17: Mittlere Gehalte an Bakterien (dargestellt als log 16S rDNA Kopien/ ml) sowie die relativen Verhältnisse einzelner Bakterien im Cluster im Fermentationszentrifugat nach 24 h *in vitro* Inkubation ohne Zusatz von Substrat (0), 4,00 g/l *Yucca schidigera*, 5,00 g/l Inulin und der Kombination aus 4,00 g/l *Yucca schidigera* mit 5,00 g/l Inulin; zusammengefasst als arithmetisches Mittel der Messwerte von Diät A und B (n = 10)

	Substratlösung, (g/l)					p-Wert*						
	0	4 YSP	5 I	4 YSP + 5 I	SEM <sup>§</sup>	Diät	YSP	I	YSP × Diät	I × Diät	YSP × I	Diät × YSP × I
<i>Clostridium coccooides</i> Cluster (Cluster XIVA)	10,2	10,8	11,2	11,4	0,27	≤ 0,001	0,002	≤ 0,001	0,121	0,080	0,053	0,503
<i>Clostridium leptum</i> Cluster (Cluster IV)	9,84	10,3	10,6	10,7	0,19	≤ 0,001	0,010	≤ 0,001	0,138	0,234	0,124	0,536
Clostridien Cluster I	9,25	9,42	9,46	9,53	0,06	≤ 0,001	0,386	0,254	0,563	0,348	0,731	0,990
<i>Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas</i> Cluster	9,31	9,75	10,2	10,4	0,24	0,001	0,005	≤ 0,001	0,212	0,072	0,202	0,573
<i>Lactobacillus</i> spp.	9,59	9,52	9,34	9,40	0,06	0,001	0,999	0,115	0,700	0,267	0,553	0,985
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9,77	9,69	10,2	10,2	0,14	0,459	0,863	≤ 0,001	0,831	0,447	0,629	0,770
<i>Clostridium perfringens</i>	6,46	6,26	7,09	6,31	0,19	≤ 0,001	0,565	0,687	0,725	0,669	0,737	0,649
<i>Escherichia/ Hafnia/ Shigella</i> Cluster	9,64	10,1	10,2	10,5	0,18	≤ 0,001	≤ 0,001	≤ 0,001	0,053	0,044	0,279	0,396
Gesamt Enterobakterien <sup>5</sup>	9,26	10,4	10,9	10,9	0,39	0,274	0,297	0,038	0,374	0,239	0,299	0,341
Verhältnis <i>Escherichia</i> Cluster innerhalb Gesamt Enterobakterien (%)	36,1	58,0	31,1	44,7	5,89	≤ 0,001	0,053	0,309	0,415	0,588	0,644	0,576
Verhältnis <i>C. perfringens</i> innerhalb Clostridien Cluster I (%)	4,41	2,09	2,93	2,32	0,52	≤ 0,001	0,019	0,305	0,098	0,600	0,160	0,323
Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen	10,8	11,2	11,6	11,7	0,21	≤ 0,001	0,021	≤ 0,001	0,310	0,114	0,183	0,737

YSP = *Yucca schidigera* Pulver; I = Inulin; <sup>§</sup>SEM = Standardfehler des Mittelwerts; <sup>\*</sup>p-Wert = Wahrscheinlichkeit von Diät- und Substratwirkungen, bestimmt durch das Allgemeine Lineare Modell; <sup>5</sup> = normalisiert auf mittlere 16S rDNA Kopien pro Genom (6) bei Enterobakterien

## 5 Diskussion

Ziel dieser Studie war es das Fermentationspotenzial von fäkalen Inokula von Hunden, die mit einer proteinarmen oder proteinreichen Diät gefüttert wurden, zu bewerten sowie die *in vitro* Effekte von *Yucca schidigera* in Kombination mit Inulin auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der fäkalen caninen Mikrobiota zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass sowohl die Fütterung der Spendertiere, als auch die *in vitro* zugegebenen Substrate, Auswirkungen auf die Zusammensetzung und mikrobielle Fermentationsaktivität der fäkalen Bakteriensuspensionen hatten. Zudem wurden Wechselwirkungen zwischen dem Proteingehalt der Diät der Spendertiere und dem *in vitro* zugesetzten Inulin festgestellt.

Limitiert ist die Aussagekraft dadurch, dass bis heute nicht bekannt ist auf welchem Wirkmechanismus die beobachteten Effekte von *Yucca schidigera* beruhen. Die Antwort auf diese Frage muss offen bleiben, da im Rahmen dieser Arbeit keine differenzierte Betrachtung der antimikrobiellen und weiteren Wirkungen der verschiedenen sekundären Pflanzenstoffe von *Yucca schidigera* durchgeführt werden konnte. Zudem existiert für den Hund kein einheitlich etabliertes *in vitro* Dickdarmfermentationsmodell, aus dem eine als wirksam ermittelte Dosis eines Substrats zu einer *in vivo* Dosierung abgeleitet werden kann.

### 5.1 Diskussion der Versuchsbedingungen und des Studiendesigns

Ziel moderner Metabolomanalysen ist es Metaboliten, die für ihre biologischen Auswirkungen auf die Wirts-Darmmikrobiota-Interaktionen in biologischen Proben wie Urin, Blut, Kot und Gewebe diskutiert werden, zu bestimmen. Infolgedessen werden Kotproben am häufigsten für die Untersuchung von Ernährungs-Darmmikrobiota-Interaktionen verwendet (Chen *et al.* 2019). Darüber hinaus führt die nicht vorhandene Zugänglichkeit des Dickdarms für Probenentnahmen dazu, dass es beim Menschen und auch bei vielen veterinärmedizinisch relevanten Tierarten erforderlich ist, auf die fäkale Mikrobiota zurückzugreifen. Die Durchführung von Untersuchungen zum Stoffwechselfpotential der Mikrobiota ist aber nicht zwangsläufig repräsentativ für die Mikrobiota des Dickdarms.

Eine Untersuchung zu Ähnlichkeiten mikrobieller Populationen in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts des Hundes identifizierte für den Dickdarm und das Rektum eine Ähnlichkeit von 57,9 % mittels denaturierender Gradient-Gel-Elektrophorese (Suchodolski *et al.* 2005). Weiterhin zeigte eine *in vitro* Untersuchung, dass die Verwendung von fäkalen

---

Inokula bei monogastrischen Tieren zu einer Unterschätzung der Anfangsrate und der maximalen Fermentation von diätetischen Fasern führen kann (Monsma und Marlett 1996). Eine aktuelle *in vitro* Studie zeigte jedoch, dass Fäzes für die Herstellung des Inokulums beim Hund verwendet werden kann, da die beobachtete Fermentationsrate vergleichbare Ergebnisse bei Ansätzen zeigte, die mit einem Inokulum aus rektalem Digest oder proximalen Kolondigest inkubiert wurden. Lediglich die Produktion von SCFA war in Proben aus dem Rektum im Vergleich zu Proben aus dem distalen Ileum, proximalen Kolon und transversalen Kolon größer, sodass dies zu einer Überschätzung der *in vivo* Fermentation führen kann (Bosch *et al.* 2008).

Wie bereits dargestellt ist für den Hund bekannt, dass, neben der Ernährung als Hauptfaktor, die individuelle Zusammensetzung der Mikrobiota im Darmtrakt auch durch andere Faktoren, wie zum Beispiel das Alter (Benno *et al.* 1992a, Simpson *et al.* 2002), die Rasse und die Körpergröße (Simpson *et al.* 2002) sowie den Körperfettgehalt (Li *et al.* 2017) beeinflusst wird. Darüber hinaus zeigt die Mikrobiota des Hundes saisonale Schwankungen (Benno *et al.* 1992b, Handl *et al.* 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine homogenisierte Sammelprobe von zwei Hunden derselben Rasse und annähernd gleichem Alter sowie Körpergewicht pro Diät erstellt um mögliche Variationsfaktoren zu reduzieren.

Die Sicherstellung eines sich streng wiederholenden Prozesses der Sammlung und Verarbeitung der Kotproben ist für den Erhalt eines qualitativ hochwertigen fäkalen Inokulums von wesentlicher Bedeutung, da die Frische und Qualität der Proben letztendlich die Effizienz der Kolonisierung des *in vitro* Systems bestimmen (Payne *et al.* 2012). Um dies zu gewährleisten, wurden in der vorliegenden Studie die Kotproben an allen fünf Tagen morgens unmittelbar nach dem Kotabsatz eingesammelt und maximal eine Stunde bis zur Weiterverarbeitung luftdicht verschlossen bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Erzeugung anaerober Bedingungen während der Inkubation wurden die Proben in eine verschlossene Kunststoffbox zusammen mit einem anaeroben Gas produzierender Beutel gestellt. Zum Nachweis der anaeroben Bedingungen wurde die Pufferlösung mit Resazurin versetzt, das als Sauerstoffindikator vorhandenen Sauerstoff mittels Farbumschlag anzeigt. Da sich weder beim Ansatz noch kurz vor dem Stoppen der Fermentation ein Farbumschlag des Indikators zeigte, kann angenommen werden, dass anaerobe Bedingungen während des Versuchs vorlagen.

Eine *in vitro* Untersuchung mit fäkalem Inokulum von Hunden in einer Verdünnung von 1:10 (w/v) stellte für drei verschiedene Fruktane mit unterschiedlicher Kettenlänge (DP = 4; 2 < bis < 60; > 22) nach einer Inkubationszeit von 4,80- 5,30 Stunden den Zeitpunkt des Auftretens der maximalen Rate der Gasproduktion fest (Bosch *et al.* 2008). Dies lässt die

Schlussfolgerung zu, dass die Inkubationszeit der vorliegenden Studie von 24 Stunden ausreichend war um das zugesetzte Inulinprodukt, dass nach Angaben des Herstellers zu 25,0 % eine DP > 10 und 75,0 % < 10 aufweist, nahezu vollständig fermentativ durch die fäkale Mikrobiota abzubauen. Untersuchungen zum bakteriellen Abbau von *Yucca schidigera* wurden bisher nicht durchgeführt.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Studie ein statisches Kurzzeitinkubationssystem mit einer Verdünnung des Inokulums von 1:10 (w/v) und einer Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt, dass bereits in einer großen Anzahl von *in vitro* Fermentationsstudien mit Hunden als Spendertieren eingesetzt wurde (Sunvold *et al.* 1995a, Sunvold *et al.* 1995b, Sunvold *et al.* 1995c, Giffard *et al.* 2001, Myint *et al.* 2017). Zudem entsprach die Inkubationszeit von 24 Stunden annähernd der Verweildauer des Chymus im Dickdarm von Hunden großer Rassen (Hernot *et al.* 2006).

Nach bestem Wissen gibt es für die Art des Mediums, das Fermentationsgefäß, das Volumen des Fermentationsansatzes sowie das Verhältnis der Flüssigkeitsoberfläche zum Fermentationsvolumen kein Standardverfahren für *in vitro* Fermentationsstudien mit Hunden als Spendertieren.

Durch die ausschließliche Verwendung der Pufferlösung als Fermentationsmedium konnte fokussiert die Interaktion, der in der Kotsuspension vorhandenen Bakterien mit den zugesetzten Substraten, betrachtet werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass mit dem Inokulum neben den Bakterien auch unverdaute Nahrungsbestandteile dem Fermentationsansatz hinzugefügt wurden, die folglich zusätzlich als Fermentationssubstrat zur Verfügung standen. Die Analyse der Rohnährstoffe der Kotproben zeigte vergleichbare Werte für die einzelnen Kotproben, die sich im Wesentlichen nur in einem um 93,0 g/kg TS höheren Rohproteingehalt bei den proteinreich gefütterten Hunden unterschieden haben.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Einfluss des Proteingehalts der Diät auf das Stoffwechsellpotential der Mikrobiota

Die Proteinquelle und -verdaulichkeit sowie die Proteinkonzentration in der Nahrung sind, wie bereits an anderer Stelle erläutert, wichtige Faktoren, die die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der Mikrobiota beeinflussen.

Der pH-Wert im Verdauungstrakt von Hunden wird durch verschiedene diätetische Faktoren beeinflusst und spiegelt die Auswirkungen der unverdauten Futtermatrix sowie der endogenen Sekrete und der mikrobiellen Stoffwechselprodukte wider, die säurebildend oder

---

alkalisierend wirken. In der vorliegenden Studie lag ein höherer pH-Wert ( $p \leq 0,001$ ) bei den Fermentationsansätzen mit fäkalem Inokulum der proteinreich gefütterten Hunde vor. Die höheren pH-Werte können die Folge des geringeren Gesamtgehalts an D- und L-Laktat sowie SCFA und einer höheren Ammoniumkonzentration im Verhältnis zu den SCFA sein. Die beobachteten Ergebnisse stimmen mit einer früheren *in vitro* Studie überein, die einen höheren pH-Wert in der Fermentationsflüssigkeit nach 24 Stunden Inkubation mit dem unverdauten Rückstand einer proteinreichen Diät analysiert hat (Pinna *et al.* 2016). Darüber hinaus haben einige *in vivo* Studien, in denen Hunde mit einer proteinreichen Ernährung gefüttert wurden, einen Anstieg des fäkalen pH-Wertes gezeigt (Zentek *et al.* 2003, Zentek *et al.* 2004, Hang *et al.* 2013).

Fermentierbare Kohlenhydrate, die nicht durch körpereigene Enzyme abgebaut wurden, gelten, neben endogenem und unverdaulichem Protein, als die Hauptsubstrate der bakteriellen Fermentation im Dickdarm. Ihre Fermentation führt zur Bildung von SCFA, insbesondere Essigsäure, Propionsäure sowie Buttersäure und anderen Metaboliten wie Laktat. Darüber hinaus verursacht der bakterielle Abbau von Proteinen im Dickdarm eine Bildung von SCFA, insbesondere die Produktion von BCFA und einer Reihe von stickstoff- und schwefelhaltigen Verbindungen wie Ammoniak (Roberfroid *et al.* 2010). In der vorliegenden Studie wurden Geflügelmehl und Griebenmehl als Proteinquellen in den Diäten eingesetzt. Geflügelmehl und Griebenmehl haben eine scheinbare ileale Proteinverdaulichkeit von 85,0- 79,0 % und 7,00- 9,00 % scheinbare Verdaulichkeit im Dickdarm (Meyer und Zentek 2016). Infolgedessen wurde bei der Fütterung der proteinreichen Diät ein erhöhter bakterieller Proteinabbau im Dickdarm der Hunde im Zusammenhang mit einer geringeren Produktion von SCFA und Laktat erwartet.

Ein geringerer Gehalt von D-Laktat ( $p = 0,041$ ) wurde in der vorliegenden Studie bei den Fermentationsansätzen mit fäkalem Inokulum der proteinreich gefütterten Hunde festgestellt. Diese Beobachtung könnte eine Anpassung der Mikrobiota an den niedrigeren Gehalt von stickstofffreien Extraktstoffen der proteinreichen Diät widerspiegeln, da Laktat als relevanter Metabolit des Kohlenhydratabbaus bekannt ist (Swanson *et al.* 2002).

In der vorliegenden Studie lag in den Fermentationsansätzen mit fäkalem Inokulum der proteinreich gefütterten Hunde eine niedrigere Gesamtmenge an SCFA ( $p \leq 0,001$ ) vor, die in erster Linie auf einen Rückgang der Essigsäure- und Propionsäurekonzentration ( $p \leq 0,001$ ) zurückzuführen war. Die analysierten Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen früherer *in vitro* (Pinna *et al.* 2016) und *in vivo* Studien (Nery *et al.* 2012, Hang *et al.* 2013) überein. In der vorliegenden Studie wurde eine verminderte Konzentration von *i*-Valeriansäure ( $p = 0,003$ ) bei den Fermentationsansätzen mit fäkalem Inokulum der

proteinreich gefütterten Hunde festgestellt. Keine Wirkung des Proteingehalts der Diät lag bei dem Gehalt von *i*-Buttersäure und der Gesamtkonzentration BCFA vor. Die Daten stehen im Kontrast zu den Ergebnissen einer vorherigen *in vivo* Studie, in der die Gesamtmenge von BCFA durch die Fütterung einer proteinreichen Diät mit Grießenmehl erhöht wurde (Hang *et al.* 2013). Eine weitere *in vivo* Studie stellte einen diätetischen Effekt auf die fäkale BCFA Konzentration durch die Art der Proteinquelle in der Diät fest, jedoch keinen Einfluss durch die Proteinkonzentration (Nery *et al.* 2012).

Die Konzentration von Ammonium war in der vorliegenden Studie in Proben mit fäkalem Inokulum der proteinreich gefütterten Hunde niedriger ( $p \leq 0,001$ ). Die beobachteten Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit den Resultaten einer früheren *in vitro* Studie, in der eine erhöhte Ammoniakkonzentration nach der Fermentation des unverdaulichen Rückstands einer proteinreichen Diät, die zuvor in einem zweistufigen *in vitro* Verfahren verdaut wurde, festgestellt wurde (Pinna *et al.* 2016). Zudem wurde in einigen *in vivo* Studien ein Anstieg der Konzentration von Ammoniak nach der Fütterung einer proteinreichen Nahrung analysiert (Nery *et al.* 2012, Hang *et al.* 2013). Der Quotient von Ammonium und der Gesamtkonzentration an SCFA war in Proben mit Inokulum der proteinarm gefütterten Hunde niedriger ( $p = 0,003$ ), was durch eine geringere relative proteolytische Aktivität im Vergleich zur gesamten bakteriellen Stoffwechselaktivität erklärt werden könnte.

Die Indolkonzentration der vorliegenden Studie war in Proben mit fäkalem Inokulum von Hunden, die eine proteinreiche Ernährung erhielten, niedriger ( $p = 0,003$ ). Im Gegensatz dazu wurde unter *in vivo* Bedingungen kein diätetischer Effekt einer hohen Proteinkonzentration auf die fäkale Konzentration von Indol bei Hunden beobachtet (Nery *et al.* 2012).

Der niedrigere pH-Wert und die höhere Konzentration von SCFA sowie Ammonium lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Bakteriensuspension der proteinarm gefütterten Hunde eine insgesamt höhere Fermentationskinetik mit gesteigerten Endproduktkonzentrationen der Kohlenhydratfermentation zeigte.

### 5.2.2 Einfluss von Inulin auf das Stoffwechsellpotential der Mikrobiota

Die Effekte von Inulin als Präbiotikum beim Hund wurden in zahlreichen *in vitro* (Vickers *et al.* 2001, Biagi *et al.* 2010, Inness *et al.* 2011) und *in vivo* Studien (Verlinden *et al.* 2006, Barry *et al.* 2009, Beloshapka *et al.* 2013) untersucht.

---

Untersuchungen zur Stabilität von oral appliziertem Inulin im Darm und dessen Lokalisation der Hauptabbauregion beim Hund fehlen. Die Daten über die Lokalisation des Abbaus von Inulin im Magen-Darm-Trakt von Schweinen sind widersprüchlich. Die Ergebnisse zweier Studien zeigten einen Hauptabbau von Inulin im Dickdarm (Yasuda *et al.* 2007, Paßlack *et al.* 2012), während andere Autoren eine präzäkale Verdaulichkeit des Inulins von 98,0 % bestimmt haben (Branner *et al.* 2004). Die Verringerung des Inulingehalts während der Passage durch den Dünndarm kann auf eine Hydrolyse durch Säure oder enzymatischen Abbau der Mikrobiota des Dünndarms zurückzuführen sein (Bach Knudsen und Hesso 1995).

*In vitro* Studien mit verschiedenen Inulinprodukten als Substrat und fäkalem Inokulum vom Hund zeigten eine erhöhte Produktion von SCFA (Vickers *et al.* 2001, Biagi *et al.* 2010, Inness *et al.* 2011). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls ein Anstieg der Gesamtkonzentration SCFA ( $p \leq 0,001$ ) durch die Zugabe von Inulin identifiziert, der mit einer erhöhten Konzentration von Essigsäure, Propionsäure und *n*-Buttersäure ( $p \leq 0,001$ ) einherging. Die Ergebnisse von *in vivo* Studien mit Hunden über die Bildung von SCFA nach der Fütterung von Inulin sind unterschiedlich. In einer Studie wurde bereits nach der Fütterung von 3,00 g/kg eines Inulinprodukts in der Diät ein Anstieg der fäkalen Konzentration von SCFA beobachtet (Propst *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen *in vivo* Studie nach der Fütterung von 4,00 g/kg eines Inulinprodukts in der Diät kein Einfluss auf den fäkalen Gehalt an SCFA festgestellt und parallel ein leichter Anstieg des fäkalen pH-Wertes analysiert (Barry *et al.* 2009). Darüber hinaus wurde in zwei *in vivo* Studien eine Senkung des fäkalen pH-Wertes nach der Fütterung von 30,0 g/kg getrocknetem Chicorée mit einem Inulingehalt von 55,0 % und 15,0 g/kg eines Inulinprodukts identifiziert. In diesen Studien wurde die Zusammensetzung der SCFA nicht analysiert, sodass keine Rückschlüsse auf den pH-Wert und die Veränderungen in der Produktion von SCFA durch Inulin möglich sind (Zentek *et al.* 2003, Verlinden *et al.* 2006). Die *in vivo* beobachteten Effekte von Inulin auf den pH-Wert stehen im Einklang mit dem in dieser Studie festgestellten niedrigeren pH-Wert ( $p \leq 0,001$ ), der durch die gleichzeitig erhöhte Produktion von Laktat und SCFA erklärt werden kann.

Erhöhte Werte von D- und L-Laktat ( $p \leq 0,001$ ) wurden in der vorliegenden Studie nach der Supplementierung von Inulin beobachtet. Diese beobachteten Effekte können damit erklärt werden, dass die fäkale Mikrobiota das zugesetzte Inulin als Kohlenhydratquelle nutzen konnte und infolgedessen Laktat als ein wichtiger Metabolit des Kohlenhydratabbaus durch laktatproduzierende Arten wie *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium* spp. produziert wurde (Swanson *et al.* 2002). Unter *in vivo* Bedingungen akkumuliert Laktat jedoch nicht signifikant

im Chymus des Kolons, mit gelegentlichen Ausnahmen für den proximalen Darmabschnitt, da es im Dickdarm im Rahmen der mikrobiellen Ökologie von anderen Bakterienarten weiter fermentiert wird (Macfarlane *et al.* 1998).

Bei der Betrachtung des Einflusses von Inulin auf die bakterielle Proteinferrmentation beim Hund hat sich gezeigt, dass erhöhte fäkale Gehalte von BCFA, Phenol sowie Indol nach der Fütterung von Inulin reduziert wurden (Propst *et al.* 2003, Barry *et al.* 2009). In der vorliegenden Studie lag eine Verringerung der Konzentration von Indol und *i*-Valeriansäure ( $p \leq 0,001$ ) nach der Supplementierung von Inulin vor. Ein Effekt auf die Gesamtkonzentration BCFA, *i*-Buttersäure und Phenol, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Konzentrationen von Histamin, Cadaverin, Spermidin, Tyramin und Spermin lagen in allen Proben unter den Nachweisgrenzen. Dies kann auf einen geringen bakteriellen Abbau von Protein in den fäkalen Bakteriensuspensionen, unter den durchgeführten *in vitro* Bedingungen, hinweisen. Die Konzentration von Putrescin wurde durch die Zugabe von Inulin erhöht ( $p \leq 0,001$ ). Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen einer früheren *in vitro* Studie, in der die Fermentation eines Fruktooligosaccharidprodukts (OPS, DP 2- 8; Beneo GmbH, Mannheim, Deutschland) zu erhöhten Konzentrationen von Putrescin und Spermin führte (Pinna *et al.* 2016). Darüber hinaus konnte auch in einer *in vivo* Studie ein linearer Anstieg von Putrescin, Cadaverin, Spermidin und dem Gesamtgehalt an Aminen nach der Fütterung eines Oligofruktoseprodukts (Raftilose P95, Orafiti, Tienen, Belgien) festgestellt werden (Propst *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu wurden in einigen *in vivo* Studien keine Effekte bei der Supplementierung von Inulin und Fruktooligosacchariden auf die fäkale Konzentration von biogenen Aminen beobachtet (Swanson *et al.* 2002, Flickinger *et al.* 2003a, Beloshapka *et al.* 2012). Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen und den in der Literatur veröffentlichten Daten erscheinen biogene Amine nicht als genauer Marker für die Beurteilung des Ablaufs der bakteriellen Proteinferrmentation.

In der vorliegenden Studie wurde die Konzentration von Ammonium ( $p \leq 0,001$ ) sowie der Quotient von Ammonium und der Gesamtkonzentration von SCFA ( $p \leq 0,001$ ) durch die Supplementierung von Inulin reduziert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Inulin als präbiotisches Substrat von saccharolytischen Bakterien als Energiequelle genutzt werden kann und dadurch die Kohlenhydratferrmentation induziert wird, was folglich zu einer höheren Umwandlung von Stickstoff in Bakterienprotein führt (Howard *et al.* 2000, Flickinger *et al.* 2003b). Die bisher beobachteten *in vitro* und *in vivo* Effekte der Supplementierung von Inulin und Fruktooligosacchariden auf den Ammoniakgehalt sind jedoch gegensätzlich. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit einer früheren *in vitro* Studie überein, die eine niedrigere Konzentration von Ammoniak nach der Inkubation eines

---

Fruktooligosaccharidprodukts mit unverdauten Resten eines proteinreichen und proteinarmen Futters analysierte (Pinna *et al.* 2016). Eine weitere *in vitro* Studie stellte jedoch höhere Konzentrationen von Ammoniak nach der Fermentation von zwei Inulinprodukten (Fibruline XL, DP > 20, Cosucra Group Warcoing, Pecq, Belgien; Beneo GR, DP 2- 60, Ø 10- 12, Beneo-Orafti S.A., Tienen, Belgien) in einer Konzentration von 1,00 g/l mit fäkalem Inokulum von Hunden, die mit einer Trockennahrung mit einem Rohproteingehalt von 252 g/kg TS gefüttert wurden, fest (Biagi *et al.* 2010). Gegensätzliche Ergebnisse wurden auch im Rahmen von *in vivo* Studien erzielt. Zwei *in vivo* Studien haben einen erhöhten fäkalen Gehalt an Ammoniak nach Fütterung von 3,00, 6,00 und 9,00 g/kg eines Inulin- und eines Oligofruktoseprodukts (Propst *et al.* 2003) und 30,0 g/kg eines Fruktooligosaccharidprodukts (Raftilose P95, Orafti, Oreya, Belgien) (Hesta *et al.* 2003) als Zusatz zu einer Diät mit einem Rohproteingehalt zwischen 327 und 500 g/kg uS festgestellt. Im Gegensatz dazu haben andere Autoren keine Unterschiede in der fäkalen Ausscheidung von Ammoniak nach der Fütterung von 2,00 und 4,00 g/kg eines Inulin- und Fruktooligosaccharidprodukts (FortiFeed P-95, GTC Nutrition, Golden, Colorado) (Barry *et al.* 2009), 5,00 g/kg eines Fruktooligo-saccharidprodukts (Raftifeed® P75, Encore Technologies, Eden Prairie, USA) (Strickling *et al.* 2000) und 10,0 g/kg eines Oligofruktoseprodukts (DP 3-20, Ø 9 Orthica B.V., Weesp, Niederlande) (Beynen *et al.* 2002) als Zusatz zu einer Diät mit einem Rohproteingehalt zwischen 300 und 312 g/kg TS beobachtet.

In der vorliegenden Studie wurde eine Verstärkung des Effekts von Inulin durch die Kombination mit dem Proteingehalt der Diät für Propionsäure ( $p = 0,030$ ) und deren relativen molaren Konzentration ( $p = 0,008$ ), *i*-Valeriansäure ( $p = 0,014$ ), der relativen molaren Konzentration *n*-Buttersäure ( $p = 0,082$ ), Ammonium ( $p = 0,092$ ), dem Quotienten von Ammonium und Gesamtkonzentration SCFA ( $p = 0,006$ ), Indol ( $p = 0,010$ ) sowie D-Laktat ( $p = 0,068$ ) beobachtet. Die Annahme, dass sich die fäkale Mikrobiota der proteinarm gefütterten Spendertiere besser an das Inulin als supplementierte Kohlenhydratquelle anpassen konnte, stellt eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte bei der Propionsäure, dem Quotienten aus Ammonium und Gesamtkonzentration SCFA sowie D-Laktat dar. Die Intensivierung des Effekts von Inulin durch die Kombination mit der proteinreichen Diät, die bei *i*-Valeriansäure, *n*-Buttersäure, Ammonium und Indol beobachtet wurde, kann derzeit nicht erklärt werden.

Es kann geschlussfolgert werden, dass Inulin in der Lage ist die mikrobielle Fermentationsaktivität der fäkalen caninen Mikrobiota anzuregen und dies zu höheren Endproduktkonzentrationen der Kohlenhydratfermentation führt, die mit mehreren positiven

Auswirkungen auf den Darm verbunden sind, wie die Stimulation der epithelialen Proliferation sowie Barrierefunktion und Modulation der Immunantwort.

### 5.2.3 Einfluss von *Yucca schidigera* auf das Stoffwechselfpotential der Mikrobiota

Die Anzahl der *in vivo* (Lowe und Kershaw 1997, Lowe *et al.* 1997, Santos *et al.* 2013, Dos Reis *et al.* 2016, Santos *et al.* 2016, Weber *et al.* 2016) und *in vitro* Studien (Giffard *et al.* 2001, Pinna *et al.* 2017) über die Wirkungen von *Yucca schidigera* bei Hunden ist gering. Das Ziel der meisten Studien mit *Yucca schidigera* bei Hunden war es, eine mögliche Verbesserung des Fäkalgeruchs zu überprüfen, jedoch zeigen die Ergebnisse kein einheitliches Bild (Lowe und Kershaw 1997, Lowe *et al.* 1997, Giffard *et al.* 2001, Dos Reis *et al.* 2016). Tierversuche zur Stabilität von oral appliziertem *Yucca schidigera* im Magen-Darm-Trakt und zum potentiellen Bereich des bakteriellen Abbaus wurden bisher nicht durchgeführt. Wie bereits zuvor angeführt wurden mehrere Theorien für die Wirkungsweise von *Yucca schidigera* publiziert, wie die Hemmung der bakteriellen Ureaseaktivität (Killeen *et al.* 1994, Paulo *et al.* 2011), die Modifikation der Darmmikrobiota durch Saponine (Killeen *et al.* 1998b, Katsunuma *et al.* 2000, Hassan *et al.* 2010) und die Bindung von Ammoniak durch die wasserlösliche saponinfreie Fraktion (Headon 1991, Makkar *et al.* 1999).

In der vorliegenden Studie führte die Zugabe von *Yucca schidigera* zu einem geringen numerischen Anstieg des Gesamtgehalts an SCFA, der in erster Linie auf einen Anstieg der Essigsäurekonzentration zurückzuführen war. Nur der relative molare Anteil von *i*-Valeriansäure wurde durch die Supplementierung von *Yucca schidigera* signifikant reduziert ( $p = 0,012$ ). Diese Daten stimmen mit einer früheren *in vitro* Studie mit fäkalem Inokulum von Hunden überein, bei der die Zugabe von 0,10 g/l *Yucca schidigera* Extrakt zu einem leichten numerischen Anstieg der gesamten flüchtigen Fettsäuren führte (Pinna *et al.* 2017). Eine weitere *in vitro* Studie mit fäkalem Inokulum von Hunden und einer Supplementierung von 0,17 g/l *Yucca schidigera* ergab eine Reduktion des Schwefelwasserstoffs, aber keine Auswirkungen auf die gesamte Gasproduktion (Giffard *et al.* 2001). Vergleichend betrachtet, zeigten die Ergebnisse einer *in vitro* Studie mit Pansenflüssigkeit von Kühen und dem Zusatz von 0,20, 0,40 und 0,60 g/l *Yucca schidigera* (Desert Yucca<sup>TM</sup>, Med-Vet Pharmaceutical Ltd., Eden Prairie, USA) ebenfalls keine Veränderungen des Gesamtgehalts der SCFA (Patra *et al.* 2012).

Der Ammoniumgehalt wurde in Proben der vorliegenden Studie durch den Zusatz von *Yucca schidigera* im Vergleich zu den nicht ergänzten Fermentationsansätzen lediglich numerisch

---

reduziert. Ähnlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde in einer früheren *in vitro* Studie mit fäkalem Inokulum von Hunden und dem Zusatz von 0,10 g/l *Yucca schidigera* Extrakt keine Reduktion von Ammoniak in der Fermentationsflüssigkeit festgestellt (Pinna *et al.* 2017). Im Gegensatz dazu wurde eine Reduktion des fäkalen Ammoniaks unter *in vivo* Bedingungen beobachtet, nachdem Hunden *Yucca schidigera* in einer Dosierung von 0,25, 0,50 und 0,75 g/kg TS (Dos Reis *et al.* 2016) sowie 0,125 g/kg Saponinextrakt von *Yucca schidigera* (Weber *et al.* 2016) der Diät gefüttert wurde. In einer weiteren Studie mit Kaninchen, die im Alter von fünf bis 13 Wochen eine Diät mit 0,25 g/kg *Yucca schidigera* Extrakt erhalten haben, wurde nach der Schlachtung ein Rückgang des Ammoniakgehalts in Proben aus dem Zäkum gemessen (Amber *et al.* 2004). Vergleichend betrachtet, konnte ebenfalls bei Wiederkäuern sowohl bei der *in vitro* Zugabe von 1,00 % (v/v) *Yucca schidigera* Extrakt (Alltech Inc., Nicholasville, USA) zur Pansenflüssigkeit von Schafen (Wallace *et al.* 1994) als auch bei der *in vivo* intraruminalen Applikation von 20,0 und 60,0 g/Tag *Yucca schidigera* (Desert King International, San Diego, USA) an Färsen (Hristov *et al.* 1999) eine Abnahme der Ammoniakkonzentration beobachtet werden. Im Zusammenhang mit den Veränderungen des Gesamtgehalts der SCFA und Ammoniumkonzentration wurde eine Reduktion des Quotienten ( $p = 0,016$ ) beobachtet.

Die Wirkungen von *Yucca schidigera* auf die *in vitro* mikrobielle Fermentationskinetik waren in der vorliegenden Studie begrenzt. Das Fehlen signifikanter Unterschiede bei den Markern der bakteriellen Proteinfermentation, wie der Konzentration von Ammonium, die in früheren Studien beobachtet wurden, kann durch die spezifische Zusammensetzung des Fermentationsmediums verursacht worden sein. Studien zu den Effekten der Zusammensetzung der Puffermedien liegen in der Literatur nicht vor.

#### 5.2.4 Einfluss von Inulin in Kombination mit *Yucca schidigera* auf das Stoffwechsellpotential der Mikrobiota

In der vorliegenden Studie führte die *in vitro* Supplementierung von Inulin in Kombination mit *Yucca schidigera* zu einem numerischen Anstieg der Produktion von SCFA, wobei dieser Anstieg durch höhere absolute Konzentrationen von Essigsäure, Propionsäure, *n*-Buttersäure und *n*-Valeriansäure bestimmt wurde. Ein Trend zur Reduktion zeigte sich nur bei dem relativen molaren Gehalt von *i*-Valeriansäure ( $p = 0,053$ ). Die Konzentration von Ammonium wurde im Vergleich zu den Fermentationsansätzen mit Inulin allein durch die Kombination von 5,00 g/l Inulin mit 2,00 sowie 4,00 g/l *Yucca schidigera* weiter numerisch

reduziert. Der Quotient von Ammonium und der Gesamtkonzentration von SCFA wurde durch die Supplementierung von beiden Substraten in Kombination signifikant reduziert ( $p = 0,031$ ).

Die beobachteten Effekte bei der Supplementierung von Inulin in Kombination mit *Yucca schidigera* lagen insgesamt nahe an den Wirkungen von Inulin allein, sodass angenommen werden kann, dass die *in vitro* Wirkungen auf die fäkale Fermentierungskinetik primär durch die Zugabe von Inulin verursacht und durch die Kombination mit *Yucca schidigera* leicht unterstützt wurden.

### 5.2.5 Einfluss des Proteingehalts der Diät auf die Zusammensetzung der Mikrobiota

Für den Hund ist bekannt, dass die Zusammensetzung der Mikrobiota im Darmtrakt und im Kot durch die Konzentration (Li *et al.* 2017) sowie die Quelle (tierisch vs. pflanzlich) (Zentek 1995b) des Nahrungsproteins beeinflusst wird. Eine *in vivo* Untersuchung zeigte, dass die Fütterung einer proteinreichen Diät den Anteil an *Firmicutes* in der fäkalen Mikrobiota erhöht, während *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* und *Fusobacteria* nahezu unbeeinflusst blieben. Auf Speziesebene wurden vermehrte Konzentrationen von *Clostridium perfringens*, *Clostridium hiranonis* und *Ruminococcus gnavus* beobachtet (Li *et al.* 2017).

Die Ergebnisse der untersuchten Kotproben der Spendertiere aus der parallel durchgeführten Studie zeigten, dass bereits *in vivo* Veränderungen in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota nach der Fütterung von Diäten mit unterschiedlichen Proteingehalten beobachtet werden konnten, obwohl nur wenige Hunde als Spender eingesetzt wurden. Die Kotproben der proteinarm gefütterten Hunde zeigten einen geringeren Anteil an *Eubacterium* spp. und höhere Anteile an *Hespellia* spp.. Die proteinreich gefütterten Hunde wiesen in den Kotproben einen geringeren Anteil an *Clostridium* spp. und *Robinsoniella* spp. auf. Die festgestellten Veränderungen in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota spiegeln eine Anpassung an den erhöhten Proteingehalt der Diäten wider. Die beobachteten Effekte stehen im Kontrast zu den Ergebnissen früherer Studien, die einen Anstieg von *Clostridium* spp. nach Verabreichung einer proteinreichen Diät festgestellt haben (Zentek *et al.* 2003; Li *et al.* 2017).

Bei Betrachtung der Ergebnisse zur Zusammensetzung der Mikrobiota der Fermentationsansätze ist zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Studie nur ein ausgewähltes Spektrum der dominierenden fäkalen Mikrobiota des Hundes untersucht wurde. Die Auswahl der Bakterien erfolgte auf Basis der zugrundegelegten Fragestellung.

---

Zur Beurteilung der potentiellen Manipulation der bakteriellen Proteinferrmentation durch den Zusatz von *Yucca schidigera* und Inulin wurden die vorwiegend saccharolytischen Genera *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* und *Clostridium* analysiert. Zusätzlich wurde das Bakterienvorkommen auf Ebene der Spezies *Clostridium perfringens* betrachtet, um ein vermehrtes Vorkommen bei steigendem Rohproteingehalt der Grundration zu erfassen, wie es bereits in vorherigen Studien erhoben wurde (Zentek *et al.* 2003, Li *et al.* 2017).

Zu *in vitro* Fermentationssystemen ist bekannt, dass die Beimpfung und Besiedlung eines Systems zu einer neu ausbalancierten Mikrobiota führen kann, die sowohl auf die einwirkenden Fermentationsbedingungen, wie unter anderem dem Kulturmedium und dem pH-Wert, als auch auf die initiale qualitative Vielfalt zurückzuführen ist, nicht aber auf das anfängliche quantitative Gleichgewicht des fäkalen Inokulums (Payne *et al.* 2012).

In der vorliegenden Studie enthielten die Fermentationsansätze mit dem fäkalem Inokulum der proteinreich gefütterten Hunde insgesamt einen geringeren Gehalt an Gesamtkopienzahl aller bakterieller Gruppen und eine reduzierte Anzahl der 16S rDNA Kopien von Clostridien Cluster XIVa und IV ( $p \leq 0,001$ ) sowie des *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas* Clusters ( $p = 0,001$ ). Auf Basis der Kenntnis, dass Vertreter der Clostridien Cluster XIVa und IV sowie des *Bacteroides/Prevotella* Clusters im Dickdarm beim Menschen vorwiegend fermentativ Kohlenhydrate abbauen (Louis *et al.* 2007, Rivière *et al.* 2016), können die analysierten Veränderungen als eine Anpassung an den geringeren Gehalt stickstofffreier Extraktstoffe der proteinreichen Diät angesehen werden. Die Beobachtungen sowie die daraus abgeleitete Annahme stehen im Einklang mit den Daten einer *in vivo* Untersuchung, in der bei Hunden, die eine proteinreiche rohe Diät (763 g/kg TS) erhalten haben, im Vergleich zu Hunden, denen eine proteinarme extrudierte Diät (299 g/kg TS) gefüttert wurde, ein geringerer Gehalt an *Bacteroides* spp. und *Prevotella* spp. im Kot nachgewiesen wurde (Birmingham *et al.* 2017). In einer weiteren *in vivo* Untersuchung konnte ebenfalls auf Ebene des Phylums ein vermindertes Vorkommen von *Bacteroidetes* im Kot bei proteinreich gefütterten Hunden (28,0 %), im Vergleich zu Hunden, die eine Diät mit einem geringen Proteingehalt erhalten haben (36,7 %), festgestellt werden (Li *et al.* 2017).

Als weiteren Effekt der Anpassung an den Proteingehalt der Diät der Spendertiere konnte ein verminderter Gehalt von *Lactobacillus* spp. ( $p = 0,001$ ) in den Fermentationsansätzen der proteinreich gefütterten Hunde festgestellt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen einer früheren *in vitro* Studie überein, die eine höhere Anzahl an *Lactobacillus* spp. in der Fermentationsflüssigkeit nach 24 Stunden Inkubation mit dem unverdauten Rückstand einer proteinarmen Diät analysiert hat (Pinna *et al.* 2016). Im Kontrast dazu steht, dass im Rahmen einer *in vivo* Untersuchung bei proteinreich gefütterten

Hunden ein höherer Gehalt an *Lactobacillus* spp. im Kot nachgewiesen wurde (Bermingham *et al.* 2017).

In der vorliegenden Studie konnte kein Einfluss des Proteingehalts der Diät der Spendertiere auf den Gesamtgehalt an Enterobakterien und *Bifidobacterium* spp. festgestellt werden. Die Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen einer früheren *in vitro* Studie überein, die keine Veränderungen in dem Vorkommen von Bifidobakterien und *Enterobacteriaceae* in der Fermentationsflüssigkeit nach 24 Stunden Inkubation mit dem unverdauten Rückstand einer proteinarmen und proteinreichen Diät beobachtet hat (Pinna *et al.* 2016). Die erhobenen *in vitro* Befunde zum Vorkommen von Bifidobakterien stehen nicht im Einklang mit den bisher ermittelten *in vivo* Daten, wobei diese auch konträr zueinanderstehen. Eine ältere *in vivo* Studie mit kulturellem Bakteriennachweis, stellte eine höhere fäkale Konzentration von Bifidobakterien bei proteinarm gefütterten Hunden fest (Zentek *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu wurde in einer aktuelleren *in vivo* Untersuchung mit 16S rRNA Gensequenzierung ein höherer Gehalt an *Bifidobacterium* spp. im Kot bei Hunden, denen eine rohe proteinreiche Diät gefüttert wurde, nachgewiesen (Bermingham *et al.* 2017).

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen ein vermindertes Vorkommen von Vertretern des *Escherichia/ Hafnia/ Shigella* Clusters sowie dessen Verhältnis innerhalb der Gesamt Enterobakterien bei den Fermentationsansätzen mit fäkalem Inokulum der proteinreich gefütterten Hunde ( $p \leq 0,001$ ). Die Daten einer *in vivo* Studie zeigen im Einklang dazu auf Ebene des Phylums eine verminderte Anzahl an *Proteobacteria* bei proteinreich gefütterten Hunden (3,94 %) im Vergleich zu Hunden, die eine proteinarme Diät erhalten haben (6,51 %) (Li *et al.* 2017).

Das Clostridien Cluster I ist die größte Clostridialgruppe und umfasst sowohl saccharolytische als auch proteolytische Arten (Collins *et al.* 1994). Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der Substratspezifität der Vertreter des Clostridien Clusters I kann die analysierte Reduktion in den Ansätzen mit fäkalem Inokulum der proteinreich gefütterten Hunde ( $p \leq 0,001$ ) nicht direkt als eine spezifische Anpassung an den Proteingehalt der Diät angesehen werden.

Auf Ebene der Spezies wurde eine Reduktion des Gehalts von *Clostridium perfringens* sowie dessen Verhältnis innerhalb des Clostridien Clusters I bei den Fermentationsansätzen der proteinreich gefütterten Hunde ermittelt ( $p \leq 0,001$ ). Im Vergleich dazu konnte in einer vorherigen *in vitro* Studie zwar kein Effekt des Proteingehalts, jedoch der Verdaulichkeit des Proteins auf das Vorkommen von *Clostridium perfringens*, erhoben werden (Pinna *et al.* 2016). Darüber hinaus bestätigen die Daten mehrerer *in vivo* Studien einen Anstieg von

---

*Clostridium perfringens* im Kot von Hunden nach der Fütterung einer proteinreichen Diät (Zentek *et al.* 2003; Li *et al.* 2017).

#### 5.2.6 Einfluss von Inulin auf die Zusammensetzung der Mikrobiota

Aufgrund des allgemein bekannten „bifidogenen Effekts“ von Inulin bei Monogastriern im Dickdarm (Gibson und Roberfroid 1995) wurde insbesondere ein Anstieg des Gehalts von *Bifidobacterium* spp. in den Fermentationsansätzen mit dem Zusatz von Inulin erwartet. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigten den fördernden Effekt von Inulin auf die Gruppe der Bifidobakterien ( $p \leq 0,001$ ). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen einer früheren *in vitro* Studie, mit fäkalem Inokulum vom Hund und dem Zusatz von 1,00 % (w/v) eines kommerziellen Inulinprodukts (Raftifeed® IPX,  $\geq 75,0$  % Inulin, Orafti, Tienen, Belgien) und einer Inkubationszeit von 24 Stunden, in der ein Anstieg in der Gruppe *Bifidobacterium* spp. und *Parascardovia denticolens* festgestellt wurde (Inness *et al.* 2011). Zudem konnte auch in mehreren *in vivo* Studien, in denen Hunde eine Diät mit Inulin und einem Proteingehalt von maximal 310 g/kg erhalten haben, ein Anstieg des Gehalts von Bifidobakterien analysiert werden (Zentek *et al.* 2003, Barry *et al.* 2009). Eine Metaanalyse, in der Daten von 15 verschiedenen *in vivo* Studien ausgewertet wurden, zeigte, dass durch die Fütterung der Präbiotika Inulin, Fruktooligosaccharide, Mannanoligosaccharide, Isomaltooligosaccharide, Hefezellwand und Xylooligosaccharide, die Anzahl an *Bifidobacterium* spp. quadratisch, mit steigender Supplementierung, ansteigt (Patra 2011). Ein vermehrter Gehalt von *Lactobacillus* spp., der aufgrund des Zusatzes von Inulin als fermentierbare Kohlenhydratquelle und dem parallel ermittelten Anstieg von D- und L-Laktat in den Fermentationsansätzen erwarten werden konnte, wurde in der vorliegenden Studie nicht festgestellt. Die bisher erhobenen Ergebnisse von *in vitro* Studien zum Einfluss von Inulin und Fruktooligosacchariden auf das Vorkommen von *Lactobacillus* spp. beim Hund sind unterschiedlich. Eine *in vitro* Studie stellte eine Reduktion von *Lactobacillus* spp. in der Fermentationsflüssigkeit nach 24 Stunden Inkubation mit 10 g/l eines Fruktooligosaccharidprodukts fest (Pinna *et al.* 2016). Die Ergebnisse einer weiteren *in vitro* Studie mit dem Zusatz von 1,00 % (w/v) eines Inulinprodukts zeigten einen höheren Gehalt an *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp., *Lactococcus lactis* spp., *Vagococcus* ssp., *Enterococcus* spp., *Melisococcus* spp., *Tetragenococcus* spp., *Catelicoccus* ssp., *Pediococcus* ssp. und *Paralactobacillus* ssp. (Inness *et al.* 2011). Die bereits zuvor erwähnte Metaanalyse stelle, auf Basis von *in vivo* Daten, einen linearen

Anstieg von *Lactobacillus* spp. mit steigender Dosierung eines Präbiotikums beim Hund fest (Patra 2011).

Vertreter der Clostridien Cluster XIVa und IV zählen beim Menschen zu den im Dickdarm am häufigsten vorkommenden Bakterien des Phylum *Firmicutes*. Sie sind bekannt dafür, dass sie eine große Spanne verschiedener nicht-verdaulicher Kohlenhydrate fermentativ abbauen können und in erster Linie Essigsäure und Buttersäure bilden (Rivière *et al.* 2016). Bakterien des *Bacteroides/Prevotella* Clusters bilden im menschlichen Kolon, durch den fermentativen Abbau von Nicht-Stärke Polysacchariden, vornehmlich Essig- und Propionsäure (Louis *et al.* 2007). In der vorliegenden Studie wurde durch die Supplementierung von Inulin eine vermehrte Anzahl an 16S rDNA Kopien der Clostridien Cluster XIVa und IV sowie *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas* Cluster und eine Steigerung der Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen ( $p \leq 0,001$ ) beobachtet. Die Ergebnisse stimmen mit den Daten einer vorherigen *in vitro* Studie, die einen Anstieg des Gehalts aller bakteriellen Gruppen sowie von *Bacteroides sensu stricto*, *Prevotella* spp., *Parabacteroides* spp., *Barnesiella viscericola* und *Odoribacter splanchnicus* nach einer Inkubation von 24 Stunden mit 1,00 % (w/v) eines Inulinprodukts identifizierte, überein (Inness *et al.* 2011). In diesem Zusammenhang konnte auch im Rahmen einer *in vivo* Untersuchung ein Anstieg der Clostridien Cluster XIVa und IV sowie *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas* Cluster bei Hunden nach der Fütterung einer kommerziellen Diät, die mit 5,60 % Sojabohnenhülsen als fermentierbare Kohlenhydratquelle angereichert wurde, festgestellt werden (Myint *et al.* 2017). Zudem wurde in einer weiteren *in vivo* Untersuchung bei Hunden ein stimulierender Effekt auf Vertreter der Clostridien Cluster XIVa und IV durch eine Anreicherung der Diät mit 12,0 % Zuckerrübenschnitzel als nicht-verdauliche Kohlenhydratquelle festgestellt (Kröger *et al.* 2017).

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Studie durch den Zusatz von Inulin eine Steigerung des *Escherichia/Hafnia/Shigella* Clusters ( $p \leq 0,001$ ) sowie der Gesamt Enterobakterien ( $p = 0,038$ ) analysiert. Vergleichbar zu den vorliegenden Ergebnissen wurde in einer *in vitro* Untersuchung mit fäkalem Inokulum von Hunden nach 24 Stunden Inkubation mit 10 g/l eines Fruktooligosaccharidprodukts ein vermehrter Gehalt von *Enterobacteriaceae* ermittelt (Pinna *et al.* 2016).

In der vorliegenden Studie war eine Verstärkung des Effekts von Inulin durch die Kombination mit dem Proteingehalt der Diät bei Clostridien Cluster XIVa ( $p = 0,080$ ), *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas* Cluster ( $p = 0,072$ ) sowie *Escherichia/Hafnia/Shigella* Cluster ( $p = 0,044$ ) zu beobachten. Diese Ergebnisse könnten durch die Annahme erklärt werden, dass die fäkale Mikrobiota der proteinarm gefütterten Spendertiere besser an

---

einen fermentativen Stoffwechsel von Kohlenhydraten angepasst war und somit Inulin als supplementierte Kohlenhydratquelle effektiver nutzen konnte.

#### 5.2.7 Einfluss von *Yucca schidigera* auf die Zusammensetzung der Mikrobiota

In der vorliegenden Studie führte die *in vitro* Supplementierung von *Yucca schidigera* zu einem Anstieg der Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen ( $p = 0,021$ ) sowie einem vermehrten Gehalt von *Escherichia/ Hafnia/ Shigella* Cluster ( $p \leq 0,001$ ) und dessen Verhältnis innerhalb der Gesamt Enterobakterien ( $p = 0,053$ ). *Lactobacillus* spp. wurde durch die Supplementierung von *Yucca schidigera* numerisch reduziert. Die beobachteten Effekte weichen von den Ergebnissen einer vorherigen *in vitro* Studie mit fäkalem Inokulum von Hunden und dem Zusatz von 0,10 g/l *Yucca schidigera* Extrakt ab. In dieser Studie lag nach 24 Stunden eine Reduktion von *Lactobacillus* spp. vor und eine numerische Verminderung der Kopien von *E. coli* (Pinna *et al.* 2017). Zudem steht der beobachtete Anstieg der Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen, vergleichend betrachtet, nicht im Einklang mit den Ergebnissen einer *in vitro* Studie mit Pansenflüssigkeit von Kühen. Die Supplementierung von 0,20, 0,40 und 0,60 g/l *Yucca schidigera* führte in dieser Untersuchung zu keinen Veränderungen der Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen (Patra *et al.* 2012).

Der ermittelte Anstieg der Kopienzahl von Clostridien Cluster XIVa ( $p = 0,002$ ), Clostridien Cluster IV ( $p = 0,010$ ), *Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas* Cluster ( $p = 0,005$ ), sowie die Reduktion des Verhältnisses von *Clostridium perfringens* innerhalb des Clostridien Cluster I ( $p = 0,019$ ) und die numerische Reduktion von *Clostridium perfringens* stehen im Einklang mit den Beobachtungen einer *in vitro* Untersuchung mit kultureller Anzucht ausgewählter Bakterienstämme. In dieser Untersuchung wurde keine hemmende Wirkung durch ein *Yucca schidigera* Saponinextrakt auf das Wachstum von *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium longum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae* und *Streptococcus bovis* festgestellt. Eine Hemmung von einzelnen Vertretern des Clostridien Cluster I wurde durch die Zugabe des *Yucca schidigera* Saponinextrakts bei *Clostridium perfringens* (14 mg/ml) und *Clostridium sporogens* (3,5 mg/ml) ermittelt (Katsunuma *et al.* 2000). Weitere *in vitro* Untersuchungen mit kultureller Anzucht der Bakterien konnten keine hemmende Wirkung für *Yucca schidigera* gegenüber *Escherichia coli* (Sen *et al.* 1998, Hassan *et al.* 2010) sowie *Salmonella typhimurium* (Hassan *et al.* 2010) nachweisen.

Wie bereits zuvor erwähnt, wird derzeit angenommen, dass die antibakterielle Wirkung der Saponine von *Yucca schidigera* vor allem auf membranolytischen Eigenschaften beruhen und weniger auf einer Veränderung der Oberflächenspannung des extrazellulären Mediums. Zudem ist die inhibitorische Aktivität mit einer Adsorption der Saponine an die Bakterien assoziiert, die durch die Dichte der mikrobiellen Population beeinflusst wird. Infolgedessen sind die Wirkungen von *Yucca schidigera* auf die Darmbakterien abhängig von der ökologischen Nische, die die Bakterien besetzten. Bakterien die synchron mit der Digesta ausgeschieden werden, scheinen vor der antibakteriellen Wirkung geschützt zu sein. Dagegen ist eine Akkumulation der Saponine und damit einhergehende Hemmung bei Bakterien, die den Darm auskleiden oder mit Futterpartikeln Sequester bilden, wahrscheinlicher (Killeen *et al.* 1998b).

In der vorliegenden Studie wurde eine Verstärkung des Effekts von *Yucca schidigera* durch die Kombination mit dem Proteingehalt der Diät für die Kopienanzahl des *Escherichia/Hafnia/Shigella* Clusters ( $p = 0,053$ ) und dem Verhältnis von *Clostridium perfringens* innerhalb des Clostridien Clusters I ( $p = 0,098$ ) beobachtet. Derzeit kann die beobachtete Intensivierung des Effekts von *Yucca schidigera* durch die Kombination mit dem Proteingehalt der Diät nicht erklärt werden.

Betrachtet man die Effekte der Supplementierung von *Yucca schidigera* auf den Gehalt und die Zusammensetzung der Bakterien im Zusammenhang mit den beobachteten Veränderungen der SCFA, könnte aus dem Anstieg der Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen und insbesondere des Clostridien Clusters XIVa und IV sowie dem numerischen Anstieg des Gesamtgehalts der SCFA geschlossen werden, dass die Bakterien das zugesetzte *Yucca schidigera* Pulver als Substrat zur Fermentation nutzen konnten. Die Annahme beruht auf dem Wissen, dass insbesondere Vertreter der Clostridien Cluster XIVa und IV dazu fähig sind, durch Fermentation einer großen Spanne verschiedener nicht-verdaulicher Kohlenhydrate, Essigsäure und Buttersäure zu produzieren (Rivière *et al.* 2016).

### 5.2.8 Einfluss von Inulin in Kombination mit *Yucca schidigera* auf die Zusammensetzung der Mikrobiota

In der vorliegenden Studie führte die *in vitro* Supplementierung von Inulin in Kombination mit *Yucca schidigera*, analog zu dem beobachteten Effekt auf die SCFA, zu einem numerischen Anstieg der Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen, der sich vor allem durch einen

---

vermehrten Gehalt von Clostridien Cluster XIVa, IV und I, *Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas* Cluster sowie *Escherichia/ Hafnia/ Shigella* Cluster auszeichnete. Ein Trend für eine vermehrte Anzahl zeigte sich nur bei Clostridien Cluster XIVa ( $p = 0,053$ ).

Wie bereits bei der Diskussion des Einflusses auf das Stoffwechsellpotential der Mikrobiota angeführt, lagen die erfassten Effekte bei der Supplementierung von Inulin in Kombination mit *Yucca schidigera* nahe an den Wirkungen von Inulin allein. Es kann somit angenommen werden, dass die *in vitro* Wirkungen auf die fäkale Mikrobiota primär durch die Zugabe von Inulin verursacht wurden und durch die Kombination mit *Yucca schidigera* leicht unterstützt wurden.

### 5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung der fäkalen Mikrobiota und den analysierten bakteriellen Metaboliten der Fermentationsansätze zeigten, dass die fäkale Bakteriensuspension von proteinarm gefütterten Hunden einen vermehrten Gehalt aller analysierten bakteriellen Gruppen und insgesamt eine erhöhte Fermentationskinetik mit höheren Endproduktkonzentrationen der Kohlenhydratfermentation aufwies.

Darüber hinaus führte die *in vitro* Supplementierung von Inulin zu einem vermehrten Vorkommen der analysierten vorwiegend saccharolytischen Bakterien, mit Ausnahme von *Lactobacillus* spp., und Stimulation der Fermentationsaktivität resultierend in höheren Konzentrationen von Endprodukten der Kohlenhydratfermentation.

Der Zusatz von *Yucca schidigera* Pulver förderte das Wachstum einzelner Bakterien, wobei die Auswirkungen auf die Bildung von Metaboliten der Proteinfermentation jedoch gering waren. Die gleichzeitige *in vitro* Supplementierung von *Yucca schidigera* Pulver und Inulin zeigte eine geringe Verstärkung der Wirkung von Inulin auf die Kohlenhydratfermentation.

Um das metabolische Potential der fäkalen Mikrobiota genauer zu betrachten, stellen weiterführende Untersuchungen zur Expressionshöhe der für die jeweiligen bakteriellen Enzyme der Protein- und Kohlenhydratfermentation kodierenden mRNA eine sinnvolle Ergänzung der vorliegenden Studie dar. Eine weitere Untersuchung der erhobenen Befunde auf die Zusammensetzung der Mikrobiota und Bildung von Metaboliten der Proteinfermentation durch die Supplementierung von *Yucca schidigera* in Kombination mit Inulin könnte im Rahmen eines *in vivo* Versuchs Aufschluss über die Wirkung auf die Verdaulichkeit der Diät und das Immunsystem der Tiere geben. Zudem wäre es zielführend,

den genauen Wirkmechanismus der bisher beobachteten Effekte von *Yucca schidigera* zu ermitteln, um den diätetischen Zusatz gezielter gestalten zu können.

Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Etablierung eines standardisierten *in vitro* Dickdarmfermentationsmodells für den Hund, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu schaffen. Darüber hinaus wäre ein Ansatz zur Ableitung von *in vitro* gewonnener Daten auf *in vivo* erstrebenswert, sodass perspektivisch die Anzahl invasiver *in vivo* Studien mit Hunden reduziert werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Vierbaum, Luisa:

### ***In vitro* Untersuchungen zum Einfluss von *Yucca schidigera* und Inulin auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der fäkalen Mikrobiota von proteinreich und -arm gefütterten Hunden**

Die vorliegende *in vitro* Studie zielte darauf ab, die Auswirkungen von *Yucca schidigera* Pulver (YSP) und Inulin (I) auf die Zusammensetzung der fäkalen caninen Mikrobiota und deren Bildung von Metaboliten der Proteinfermentation (kurz- (SCFA) und verzweigtkettige Fettsäuren (BCFA), phenolische und indolische Verbindungen, biogene Amine, Ammonium und pH-Wert) unter Verwendung von fäkalem Inokulum von Hunden, die mit einem proteinarmen (A) oder -reichen Futter (B) (201 oder 377 g/kg uS) gefüttert wurden, zu untersuchen. Neun Substratansätze für jede Diät wurden *in vitro* in einem statischen Kurzzeitinkubationssystem für 24 Stunden inkubiert und anschließend ausgewertet: (1) Kontrolle ohne Zusatz von Substrat; (2) 2,00 g/l YSP; (3) 4,00 g/l YSP; (4) 2,00 g/l YSP und 1,00 g/l I; (5) 4,00 g/l YSP und 1,00 g/l I; (6) 2,00 g/l YSP und 5,00 g/l I; (7) 4,00 g/l YSP und 5,00 g/l I; (8) 1,00 g/l I; (9) 5,00 g/l I in der Fäkalsuspension von Hunden, die mit Futter A oder B gefüttert wurden. Mehrere Veränderungen wurden in der Zusammensetzung der Fermentationsmetaboliten analysiert. Proben, die mit dem fäkalem Inokulum von Hunden inkubiert wurden, die mit Diät B gefüttert wurden, produzierten geringere Konzentrationen von SCFA total, Essig-, Propion- ( $p \leq 0,001$ ), *i*-Valeriansäure ( $p = 0,003$ ), D-Laktat ( $p = 0,041$ ) und Indol ( $p = 0,003$ ), während der pH-Wert ( $p \leq 0,001$ ) anstieg. Die Supplementierung von I erhöhte den Gehalt an Putrescin, D- und L-Laktat, SCFA total, Essig-, Propion-, *n*-Buttersäure ( $p \leq 0,001$ ), während *i*-Valeriansäure, Indol und der pH-Wert ( $p \leq 0,001$ ) reduziert wurden. Ammonium war niedriger ( $p \leq 0,001$ ) in Proben mit fäkalem Inokulum von Hunden, die mit Diät B gefüttert wurden, und weiter reduziert durch den Zusatz von I ( $p \leq 0,001$ ). Proben mit fäkalem Inokulum von Hunden, die mit der Diät A gefüttert wurden, hatten einen geringeren Quotienten von Ammonium und SCFA insgesamt ( $p = 0,003$ ). Die Ergänzung von YSP ( $p = 0,016$ ), I ( $p \leq 0,001$ ), die Kombination von I und Diät A ( $p = 0,006$ ) und YSP in Kombination mit I ( $p = 0,031$ ) führten zu einer weiteren Reduktion des Quotienten von Ammonium und Gesamtkonzentration SCFA. Die Gesamtkopienzahl aller bakteriellen Gruppen war bei Proben, die mit dem fäkalem Inokulum

von Hunden inkubiert wurden, die mit Diät A gefüttert wurden sowie dem Zusatz von I ( $p \leq 0,001$ ) und YSP ( $p = 0,021$ ), erhöht. Der Proteingehalt der Diät und die Supplementierung von I sowie YSP zeigten zahlreiche positive Effekte auf das Vorkommen der analysierten Bakterien.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Proteingehalt der Diät und die *in vitro* Supplementierung von I und YSP zu einer Stimulation des Wachstums und der Fermentationskinetik der fäkalen Mikrobiota führten, wobei YSP nur geringe Auswirkungen auf die Bildung von Proteinfermentationsmetaboliten zu haben schien.

## 7 Summary

Vierbaum, Luisa:

### ***In vitro* evaluation of the effects of *Yucca schidigera* and inulin on composition and metabolism of faecal microbiota of high- and low-protein fed dogs**

This *in vitro* study aimed to evaluate the effects of *Yucca schidigera* powder (YSP) and inulin (I) on composition of faecal microbiota and its formation of protein fermentation metabolites (short (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA), phenolic and indolic compounds, biogenic amines, ammonia and pH) by using faecal inocula from dogs fed either a low (A) or a high (B) protein diet (crude protein 201 or 377 g/kg as fed). Nine treatments for each diet were evaluated in an *in vitro* batch culture system over 24 h: (1) control with no addition of substrate; (2) 2,00 g/l YSP; (3) 4,00 g/l YSP; (4) 2,00 g/l YSP and 1,00 g/l I; (5) 4,00 g/l YSP and 1,00 g/l I; (6) 2,00 g/l YSP and 5,00 g/l I; (7) 4,00 g/l YSP und 5,00 g/l I; (8) 1,00 g/l I; (9) 5,00 g/l I of faecal culture of dogs fed diet A or B. Several changes in fermentation metabolites were analysed. Samples incubated with the faecal inocula of dogs fed diet B produced lower concentrations of total SCFA, acetate, propionate ( $p \leq 0.001$ ), *i*-valerate ( $p = 0.003$ ), D-lactate ( $p = 0.041$ ) and indole ( $p = 0.003$ ), whereas pH ( $p \leq 0.001$ ) was increased. Supplementation of I increased the content of putrescine, D- and L-lactate, total SCFA, acetate, propionate, *n*-butyrate ( $p \leq 0.001$ ), while *i*-valerate, indole and pH ( $p \leq 0.001$ ) were reduced. Ammonia was lower ( $p \leq 0.001$ ) in samples with faecal inocula from dogs fed diet B and further reduced by the addition of I ( $p \leq 0.001$ ). Samples with faecal inocula from dogs fed diet A had a fewer quotient of ammonia and total SCFA ( $p = 0.003$ ). Supplementation of YSP ( $p = 0.016$ ), I ( $p \leq 0.001$ ), I in combination with diet A ( $p = 0.006$ ) and YSP in combination with I ( $p = 0.031$ ) led to a further reduction of the quotient of ammonia and total SCFA. Total number of copies of all bacterial groups was increased in samples incubated with faecal inoculum from dogs fed diet A, the supplementation of I ( $p \leq 0.001$ ) and YSP ( $p = 0.021$ ). Protein content of the diet as well as supplementation of I and YSP showed numerous positive effects on the abundance of the analysed bacteria. In conclusion, dietary protein concentration and the *in vitro* supplementation of I and YSP led to a stimulation of growth and fermentation intensity of the faecal microbiota, whereby YSP appeared to have only minor effects on the formation of protein fermentation metabolites.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ahrens, R., Gäbel, G., Garz, B., Aschenbach, J.R., 2003. Histamine-induced chloride secretion is mediated via H<sub>2</sub>-receptors in the pig proximal colon. *Inflammation Research* 52 (2), 79-85.
- Alagawany, M., El-Hack, M.E.A., El-Kholy, M.S., 2016. Productive performance, egg quality, blood constituents, immune functions, and antioxidant parameters in laying hens fed diets with different levels of *Yucca schidigera* extract. *Environmental Science and Pollution Research* 23 (7), 6774-6782.
- Amber, K.H., Yakout, H.M., Hamed Rawya, S., 2004. Effect of feeding diets containing yucca extract or probiotic on growth, digestibility, nitrogen balance and caecal microbial activity of growing new zealand white rabbits. In: *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress* 737-745.
- Amtsberg, G., Drochner, W., Meyer, H., 1980. Influence of food composition on the intestinal flora of the dog. In: *Nutrition of the dog and cat : Waltham symposium* S. 181-188.
- Argenzio, R.A., Eisemann, J., 1996. Mechanisms of acid injury in porcine gastroesophageal mucosa. *American Journal of Veterinary Research* 57 (4), 564-573.
- Aslan, R., Dundar, Y., Eryavuz, A., Bulbul, A., Kuçukkurt, I., Fidan, A., Akinci, Z., 2005. Effects of various quantities of *Yucca schidigera* powder (Deodorase) added to diets on the performance, some hematological and biochemical blood parameters, and total antioxidant capacity of laying hens. *Revista de Medicina Veterinaria* 6, 350-355.
- Bach Knudsen, K.E., Hesso, I., 1995. Recovery of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in the small intestine of man. *British Journal of Nutrition* 74 (1), 101-113.
- Baillon, M.-L.A., Marshall-Jones, Z.V., Butterwick, R.F., 2004. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. *American Journal of Veterinary Research* 65 (3), 338-343.
- Banwell, J.G., Boldt, D.H., Meyers, J., Weber, F.L. Jr., 1983. Phytohemagglutinin Derived From Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*): A Cause for Intestinal Malabsorption Associated With Bacterial Overgrowth in the Rat. *Gastroenterology* 84 (3), 506-515.
- Banwell, J.G., Howard, R., Cooper, D., Costerton, J.W., 1985. Intestinal Microbial Flora after Feeding Phytohemagglutinin Lectins (*Phaseolus vulgaris*) to Rats. *Applied and Environmental Microbiology* 50 (1), 68-80.
- Barry, K.A., Hernot, D.C., Middelbos, I.S., Francis, C., Dunsford, B., Swanson, K.S., Fahey, G.C. Jr., 2009. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient

- digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. *Journal of Animal Science* 87 (10), 3244-3252.
- Barszcz, M., Taciak, M., Skomiał, J., 2016. The effects of inulin, dried Jerusalem artichoke tuber and a multispecies probiotic preparation on microbiota ecology and immune status of the large intestine in young pigs. *Archives of Animal Nutrition* 70 (4), 278-292.
- Beloshapka, A.N., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M., Duclos, L., Swanson, K.S., 2013. Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology* 84 (3), 532-541.
- Beloshapka, A.N., Duclos, L.M., Vester Boler, B.M., Swanson, K.S., 2012. Effects of inulin or yeast cell-wall extract on nutrient digestibility, fecal fermentative end-product concentrations, and blood metabolite concentrations in adult dogs fed raw meat-based diets. *American Journal of Veterinary Research* 73 (7), 1016-1023.
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka, T., 1992a. Impact of the Advances in Age on the Gastrointestinal Microflora of Beagle Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* 54 (4), 703-706.
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka, T., 1992b. Individual and Seasonal Variations in the Composition of Fecal Microflora of Beagle Dogs. *Bifidobacteria and Microflora* 11 (2), 69-76.
- Bergman, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews* 70 (2), 567-590.
- Bermingham, E.N., Maclean, P., Thomas, D.G., Cave, N.J., Young, W., 2017. Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. *PeerJ* 5, e3019.
- Beynen, A.C., Baas, J.C., Hoekemeijer, P.E., Kappert, H.J., Bakker, M.H., Koopman, J.P., Lemmens, A.G., 2002. Faecal bacterial profile, nitrogen excretion and mineral absorption in healthy dogs fed supplemental oligofructose. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 86 (9-10), 298-305.
- Biagi, G., Cipollini, I., Grandi, M., Zaghini, G., 2010. Influence of some potential prebiotics and fibre-rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota. *Animal Feed Science and Technology* 159 (1-2), 50-58.
- Biourge, V., Vallet, C., Levesque, A., Sergheraert, R., Chevalier, S., Roberton, J.-L., 1998. The use of Probiotics in the Diet of Dogs. *Journal of Nutrition* 128 (12), 2730S-2732S.

- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J.F., Tomé, D., 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 33 (4), 547-562.
- Blank, R., Mosenthin, R., Sauer, W.C., Huang, S., 1999. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science* 77 (11), 2974-2984.
- Bosch, G., Pellikaan, W.F., Rutten, P.G.P., van der Poel, A.F.B., Verstegen, M.W.A., Hendriks, W., 2008. Comparative in vitro fermentation activity in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fiber sources. *Journal of Animal Science* 86 (11), 2979-2989.
- Bosch, G., Vervoort, J.J.M., Hendriks, W.H., 2016. In vitro digestibility and fermentability of selected insects for dog foods. *Animal Feed Science and Technology* 221 (A), 174-184.
- Bosch, G., Wrigglesworth, D.J., Cone, J.W., Pellikaan, W.F., Hendriks, W.H., 2013. Effects of preservation conditions of canine feces on in vitro gas production kinetics and fermentation end products. *Journal of Animal Science* 91 (1), 259-267.
- Branner, G.R., Böhmer, B.M., Erhardt, W., Henke, J., Roth-Maier, D.A., 2004. Investigation on the precaecal and faecal digestibility of lactulose and inulin and their influence on nutrient digestibility and microbial characteristics. *Archives of Animal Nutrition* 58 (5), 353-366.
- Çabuk, M., Alçiçek, A., Bozkurt, M., Akkan S., 2004. Effect of *Yucca schidigera* and Natural Zeolite on Broiler Performance. *International Journal of Poultry Science* 3 (10), 651-654.
- Calabrò, S., Carciofi, A.C., Musco, N., Tudisco, R., Gomes, M.O.S., Cutrignelli, M.I., 2013. Fermentation Characteristics of Several Carbohydrate Sources for Dog Diets Using the *In Vitro* Gas Production Technique. *Italian Journal of Animal Science* 12 (1), e4.
- Cheeke, P.R., 2001. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 13, 115-126.
- Chen, M.X., Wang, S.-Y., Kuo, C.-H., Tsai, I.-L., 2019. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. *Journal of the Formosan Medical Association* 118, S10-S22.
- Cheng, S.X., Geibel, J.P., Hebert, S.C., 2004. Extracellular polyamines regulate fluid secretion in rat colonic crypts via the extracellular calcium-sensing receptor. *Gastroenterology* 126 (1), 148-158.

- 
- Clinton, S.K., Bostwick, D.G., Olson, L.M., Mangian, H.J., Visek, W.J., 1988. Effects of Ammonium Acetate and Sodium Cholate on *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced Colon Carcinogenesis of Rats. *Cancer Research* 48 (11), 3035-3039.
- Coles, L., Moughan, P., Darragh, A., 2005. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology* 123-124 (1), 421-444.
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E., 1994. The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44 (4), 812-826.
- Cook, S.I., Sellin, J.H., 1998. Review article: Short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 12 (6), 499-507.
- Cremin, J.D. Jr., Fitch, M.D., Fleming, S.E., 2003. Glucose alleviates ammonia-induced inhibition of short-chain fatty acid metabolism in rat colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 285 (1), G105-G114.
- Darcy-Vrillon, B., Cherbuy, C., Morel, M.-T., Durand, M., Duée, P.-H., 1996. Short chain fatty acid and glucose metabolism in isolated pig colonocytes: modulation by  $\text{NH}_4^+$ . *Molecular and Cellular Biochemistry* 156 (2), 145-151.
- Darkoh, C., Plants-Paris, K., Bishoff, D., DuPont, H.L., 2019. *Clostridium difficile* Modulates the Gut Microbiota by Inducing the Production of Indole, an Interkingdom Signaling and Antimicrobial Molecule. *mSystems* 4 (2), e00346-18.
- Delzenne, N.M., 2003. Oligosaccharides: State of the art. *Proceedings of the Nutrition Society* 62 (1), 177-182.
- Deng, P., Swanson, K.S., 2015. Gut microbiota of humans, dogs and cats: Current knowledge and future opportunities and challenges. *British Journal of Nutrition* 113 (S 1), S6-S17.
- Diez, M., Hornick, J.L., Baldwin, P., van Eenaeme, C., Istasse, L., 1998. The influence of sugar-beet fibre, guar gum and inulin on nutrient digestibility, water consumption and plasma metabolites in healthy Beagle dogs. *Research in Veterinary Science* 64 (2), 91-96.
- Dos Reis, J.S., Zangeronimo, M.G., Ogoshi, R.C.S., Franca, J., Costa, A.C., Almeida, T.N., Dos Santos, J.P.F., Pires, C.P., Chizzotti, A.F., Leite, C.A.V., Saad, F.M.O.B., 2016. Inclusion of *Yucca schidigera* extract in diets with different protein levels for dogs. *Animal Science Journal* 87 (8), 1019-27.

- Edwards, C.A., Gibson, G., Champ, M., Jensen, B.-B., Mathers, J.C., Nagengast, F., Rumney, C., Quehl, A., 1996. *In Vitro* Method for Quantification of the Fermentation of Starch by Human Faecal Bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71 (2), 209-217.
- Eisenhauer, A.L., 2019. Effekte von Diäten mit unterschiedlichen Proteingehalten und Faserstoffen auf verdauungsphysiologische Parameter beim Hund. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin.
- Ellegård, L., Andersson, H., Bosaeus, I., 1997. Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 51, 1-5.
- Elsden, S.R., Hilton, M.G., 1978. Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia. *Archives of Microbiology* 117 (2), 165-172.
- Faber, T.A., Bauer, L.L., Price, N.P., Hopkins, A.C., Fahey, G.C. Jr., 2011. *In Vitro* Digestion and Fermentation Characteristics of Temulose Molasses, a Coproduct of Fiberboard Production, and Select Temulose Fractions Using Canine Fecal Inoculum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (5), 1847-1853.
- Fan, P., Li, L., Rezaei, A., Eslamfam, S., Che, D., Ma, X., 2015. Metabolites of Dietary Protein and Peptides by Intestinal Microbes and their Impacts on Gut. *Current Protein and Peptide Science* 16 (7), 646-654.
- Félix, A.P., Zanatta, C.P., Brito, C.B.M., Sá Fortes, C.M.L., Oliveira, S.G., Maiorka, A., 2013. Digestibility and metabolizable energy of raw soybeans manufactured with different processing treatments and fed to adult dogs and puppies. *Journal of Animal Science* 91 (6), 2794-2801.
- Fioramonti, J., Fargeas, M.J., Bertrand, V., Pradayrol, L., Bueno, L., 1994. Induction of postprandial intestinal motility and release of cholecystokinin by polyamines in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 267 (6), G960-G965.
- Flickinger, E.A., Schreijen, E.M.W.C., Patil, A.R., Hussein, H.S., Grieshop, C.M., Merchen, N.R., Fahey, G.C. Jr., 2003a. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *Journal of Animal Science* 81 (8), 2008-2018.
- Flickinger, E.A., van Loo, J., Fahey, G.C., 2003b. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: A review. *Food Science and Nutrition* 43 (1), 19-60.

- 
- Franck, A., 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87 (S2), S287-S291.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Heikkilä, T., Pernu, N., Kovanen, S., Hielm-Björkman, A., Kivistö, R., 2017. Raw Meat-Based Diets in Dogs and Cats. *Veterinary Sciences* 4 (33).
- Garcia-Mazcorro, J.F., Suchodolski, J.S., Jones, K.R., Clark-Price, S.C., Dowd, S.E., Minamoto, Y., Markel, M., Steiner, J.M., Dossin, O., 2012. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiology Ecology* 80 (3), 624-636.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *Journal of Nutrition* 125 (6), 1401-1412.
- Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., Buddington, R., 2010. Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* 7 (1), 1-19.
- Giffard, C.J., Collins, S.B., Stoodley, N.C., Butterwick, R.F., Batt, R.M., 2001. Administration of charcoal, yucca schidigera, and zinc acetate to reduce malodorous flatulence in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218 (6), 892-6.
- Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Fahey, G.C. Jr., 2002. Oral Administration of Arabinogalactan Affects Immune Status and Fecal Microbial Populations in Dogs. *Journal of Nutrition* 132 (3), 478-482.
- Guarner, F., Malagelada, J.-R., 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet* 361 (9356), 512-519.
- Guilford, W.G., Roudebush, P., Rogers, Q.R., 1994. The histamine content of commercial pet foods. *New Zealand Veterinary Journal* 42 (6), 201-204.
- Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., Brummer, R.-J., 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 27 (2), 104-119.
- Handl, S., Dowd, S.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology* 76 (2), 301-310.
- Handl, S., German, A.J., Holden, S.L., Dowd, S.E., Steiner, J.M., Heilmann, R.M., Grant, R.W., Swanson, K.S., Suchodolski, J.S., 2013. Faecal microbiota in lean and obese dogs. *FEMS Microbiology Ecology* 84 (2), 332-343.

- Hang, I., Heilmann, R.M., Grützner, N., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M., Atroshi, F., Sankari, S., Kettunen, A., De Vos, W.M., Zentek, J., Spillmann, T., 2013. Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs. *BMC Veterinary Research* 9 (1), 201.
- Harmsen, H.J.M., Raangs, G.C., Franks, A.H., Wildeboer-Veloo, A.C.M., Welling, G.W., 2002. The Effect of the Prebiotic Inulin and the Probiotic *Bifidobacterium longum* on the Fecal Microflora of Healthy Volunteers Measured by FISH and DGGE. *Microbial Ecology in Health and Disease* 14 (4), 212-220.
- Hassan, S.M., Byrd, J.A., Cartwright, A.L., Bailey, C.A., 2010. Hemolytic and Antimicrobial Activities Differ Among Saponin-rich Extracts From Guar, Quillaja, Yucca, and Soybean. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162 (4), 1008-1017.
- Headon, D.R., Buggle, K., Nelson, A., Killeen, G., 1991. Glycofractions of the Yucca plant and their role in ammonia control. *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 8th Annual Symposium* 95-108.
- Heerdt, B.G., Houston, M.A., Augenlicht, L.H., 1994. Potentiation by Specific Short-Chain Fatty Acids of Differentiation and Apoptosis in Human Colonic Carcinoma Cell Lines. *Cancer Research* 54 (12), 3288-3294.
- Hendriks, W.H., van Baal, J., Bosch, G., 2012. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants—a comparative species view. *British Journal of Nutrition* 108 (S2), S247-S257.
- Hernot, D.C., Dumon, H.J., Biourge, V.C., Martin, L.J., Nguyen, P.G., 2006. Evaluation of association between body size and large intestinal transit time in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research* 67 (2), 342-347.
- Hesta, M., Janssens, G.P.S., Millet, S., De Wilde, R., 2003. Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. *British Journal of Nutrition* 90 (6), 1007-1014.
- Holdeman, L.V., Cato, E.P., Moore, W.E.C., 1977. *Anaerobe laboratory manual*, University of Michigan, Virginia Polytechnic Institute and State University, Anaerobe Laboratory
- Howard, M.D., Kerley, M.S., Sunvold, G.D., Reinhart, G.A., 2000. Source of dietary fiber fed to dogs affects nitrogen and energy metabolism and intestinal microflora populations. *Nutrition Research* 20 (10), 1473-1484.
- Howarth, N.C., Saltzman, E., Roberts, S.B., 2001. Dietary Fiber and Weight Regulation. *Nutrition Reviews* 59 (5), 129-139.

- 
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., van Herk, F.H., Cheng, K.-J., Newbold, C.J., Cheeke, P.R., 1999. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *Journal of Animal Science* 77 (9), 2554-2563.
- Hughes, R., Kurth, M.J., McGilligan, V., McGlynn, H., Rowland, I., 2008. Effect of Colonic Bacterial Metabolites on Caco-2 Cell Paracellular Permeability In vitro. *Nutrition and Cancer* 60 (2), 259-266.
- Hughes, R., Magee, E.A.M., Bingham, S., 2000. Protein Degradation in the Large Intestine: Relevance to Colorectal Cancer. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1 (2), 51-58.
- Hussein, H.S., Sunvold, G.D., 2000. Dietary Strategies to Decrease Dog and Cat Fecal Odor Components. In: *Recent Advances in Canine and Feline Nutrition. Iams nutrition symposium proceedings*. 3, 153-168.
- Hussein, H.S., Flickinger, E.A., Fahey, G.C. Jr., 1999. Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. *Journal of Nutrition* 129 (7), 1454S-1456S.
- Inness, V.L., Khoo, C., Gross, K.L., Hoyles, L., Gibson, G.R., McCartney, A.L., 2011. Use of static batch culture systems to investigate the fermentation effects of selected oligosaccharides and fibres by the canine faecal microbiota. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 6 (1), 57-64.
- Jaskiewicz, J., Zhao, Y., Hawes, J.W., Shimomura, Y., Crabb, D.W., Harris, R.A., 1996. Catabolism of Isobutyrate by Colonocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 327 (2), 265-270.
- Johnston, N.L., Quarles, C.L., Fagerberg, D.J., Caveny, D.D., 1981. Evaluation of Yucca Saponin on Broiler Performance and Ammonia Suppression. *Poultry Science* 60 (10), 2289-2292.
- Kasiraj, A.C., Harmoinen, J., Isaiah, A., Westermarck, E., Steiner, J.M., Spillmann, T., Suchodolski, J.S., 2016. The effects of feeding and withholding food on the canine small intestinal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (6), fiw085.
- Katsunuma, Y., Nakamura, Y., Toyoda, A., Minato, H., 2000. Effect of *Yucca Shidigera* Extract and Saponins on Growth of Bacteria Isolated from Animal Intestinal Tract. *Animal Science Journal* 71 (2), 164-170.
- Kaur, N., Gupta, A.K., 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences* 27 (7), 703-714.
- Kelly-Quagliana, K.A., Nelson, P.D., Buddington, R.K., 2003. Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice. *Nutrition Research* 23 (2), 257-267.

- Killeen, G.F., Buggle, K.A., Hynes, M.J., Walsh, G.A., Power, R.F., Headon, D.R., 1994. Influence of *Yucca schidigera* Preparations on the Activity of Urease from *Bacillus pasteurii*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65 (4), 433-440.
- Killeen, G.F., Connolly, C.R., Walsh, G.A., Duffy, C.F., Headon, D.R., Power, R.F., 1998a. The Effects of Dietary Supplementation with *Yucca schidigera* Extract or Fractions thereof on Nitrogen Metabolism and Gastrointestinal Fermentation Processes in the Rat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76 (1), 91-99.
- Killeen, G.F., Madigan, C.A., Connolly, C.R., Walsh, G.A., Clark, C., Hynes, M.J., Timmins, B.F., James, P., Headon, D.R., Power, R.F., 1998b. Antimicrobial Saponins of *Yucca schidigera* and the Implications of Their in Vitro Properties for Their in Vivo Impact. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (8), 3178-3186.
- Kleessen, B., Schwarz, S., Boehm, A., Fuhrmann, H., Richter, A., Henle, T., Krueger, M., 2007. Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. *British Journal of Nutrition* 98 (3), 540-549.
- Kleessen, B., Sykura, B., Zunft, H.-J., Blaut, M., 1997. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *American Journal of Clinical Nutrition* 65 (5), 1397-1402.
- Kröger, S., Vahjen, W., Zentek, J., 2017. Influence of lignocellulose and low or high levels of sugar beet pulp on nutrient digestibility and the fecal microbiota in dogs. *Journal of Animal Science* 95 (4), 1598-1605.
- Kruse, H.-P., Kleessen, B., Blaut, M., 1999. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *British Journal of Nutrition* 82 (5), 375-382.
- Lee, J.-H., Lee, J., 2010. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews* 34 (4), 426-444.
- Lentle, R.G., Janssen, P.W.M., 2008. Physical characteristics of digesta and their influence on flow and mixing in the mammalian intestine: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 178 (6), 673-690.
- Li, Q., Lauber, C.L., Czarnecki-Maulden, G., Pan, Y., Hannah, S.S., 2017. Effects of the Dietary Protein and Carbohydrate Ratio on Gut Microbiomes in Dogs of Different Body Conditions. *mBio* 8 (1), e01703-16.
- Lin, H.-C., Visek, W.J., 1991. Large Intestinal pH and Ammonia in Rats: Dietary Fat and Protein Interactions. *Journal of Nutrition* 121 (6), 832-843.
- Liu, H., Zhang, J., Zhang, S., Yang, F., Thacker, P.A., Zhang, G., Qiao, S., Ma, X., 2014. Oral Administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 Favors Intestinal Development

- and Alters the Intestinal Microbiota in Formula-Fed Piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (4), 860-866.
- Loo, J.v., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*, 81, 121-132.
- Louis, P., Hold, G.L., Flint, H.J., 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology* 12 (10), 661-672.
- Louis, P., Scott, K.P., Duncan, S.H., Flint, H.J., 2007. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology* 102 (5), 1197-1208.
- Lowe, J.A., Kershaw, S.J., 1997. The ameliorating effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal aroma. *Research in Veterinary Science* 63 (1), 61-66.
- Lowe, J.A., Kershaw, S.J., Taylor, A.J., Linforth, R.S.T., 1997. The effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal volatiles occurring concurrently with faecal aroma amelioration. *Research in Veterinary Science* 63 (1), 67-71.
- Ma, N., Tian, Y., Wu, Y., Ma, X., 2017. Contributions of the Interaction Between Dietary Protein and Gut Microbiota to Intestinal Health. *Current Protein and Peptide Science* 18 (8), 795-808.
- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R., Beatty, E., Cummings, J.H., 1992a. Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. *FEMS Microbiology Ecology* 101 (2), 81-88.
- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R., Cummings, J.H., 1992b. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Journal of Applied Microbiology* 72 (1), 57-64.
- Macfarlane, G.T., Allison, C., 1986. Utilisation of protein by human gut bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 38 (1), 19-24.
- Macfarlane, G.T., Macfarlane, S., 2007. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 156-162.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society* 62 (1), 67-72.
- Macfarlane, S., Quigley, M.E., Hopkins, M.J., Newton, D.F., Macfarlane, G.T., 1998. Polysaccharide degradation by human intestinal bacteria during growth under multi-

- substrate limiting conditions in a three-stage continuous culture system. *FEMS Microbiology Ecology* 26 (3), 231-243.
- Makkar, H.P.S., Aregheore, E.M., Becker, K., 1999. Effect of saponins and plant extracts containing saponins on the recovery of ammonia during urea-ammoniation of wheat straw and fermentation kinetics of the treated straw. *Journal of Agricultural Science* 132 (3), 313-321.
- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttilä, T., Palva, A., 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149 (1), 269-277.
- Marciňáková, M., Simonová, M., Strompfová, V., Lauková, A., 2006. Oral application of *Enterococcus faecium* strain EE3 in healthy dogs. *Folia Microbiologica* 51 (3), 239-242.
- Maria, A.P.J., Ayane, L., Putarov, T.C., Loureiro, B.A., Neto, B.P., Casagrande, M.F., Gomes, M.O.S., Gloria, M.B.A., Carciofi, A.C., 2017. The effect of age and carbohydrate and protein sources on digestibility, fecal microbiota, fermentation products, fecal IgA, and immunological blood parameters in dogs. *Journal of Animal Sciences* 95 (6), 2452-2466.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., Tanaka, R., 2004. Use of 16s rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12), 7220-7228.
- Meyer, H., Zentek, J., 2016. Verdauung und Absorption. In: *Ernährung des Hundes, Grundlagen-Fütterung-Diätetik*. 8., aktualisierte Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, S. 48-57.
- Meyer, H., Zentek, J., Habernoll, H., Maskell, I., 1999. Digestibility and Compatibility of Mixed Diets and Faecal Consistency in Different Breeds of Dog. *Journal of Veterinary Medicine A* 46 (3), 155-166.
- Middelbos, I.S., Fastinger, N.D., Fahey, G.C Jr., 2007. Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. *Journal of Animal Science* 85 (11), 3033-3044.
- Middelbos, I.S., Boler, B.M.V., Qu, A., White, B.A., Swanson, K.S., Fahey G.C. Jr., 2010. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *PLoS one* 5 (3), e9768.

- 
- Mirza, I.H., Khan, A.G., Azim, A., Mirza, M.A., 2002. Effect of Supplementing Grazing Cattle Calves with Urea-molasses Blocks, with and without *Yucca schidigera* Extract, on Performance and Carcass traits. Asian Australasian Journal of Animal Sciences 15 (9), 1300-1306.
- Molitor, D., 1996. *In vitro*- und *in vivo*-Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) als Futterzusatz bei Hunden. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Monsma, D.J., Marlett, J.A., 1996. Fermentation of Carbohydrate in Rat Ileal Excreta Is Enhanced with Cecal Inocula Compared with Fecal Inocula. Journal of Nutrition 126 (2), 554-563.
- Mück, S., 2007. Einsatz von *Enterococcus faecium* DSM 7134 beim adulten Hund. Dissertation. Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien.
- Musch, M.W., Bookstein, C., Xie, Y., Sellin, J.H., Chang, E.B., 2001. SCFA increase intestinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 280 (4), G687-G693.
- Myint, H., Iwahashi, Y., Koike, S., Kobayashi, Y., 2017. Effect of soybean husk supplementation on the fecal fermentation metabolites and microbiota of dogs. Animal Science Journal 88 (11), 1730-1736.
- Naumann, K., Bassler, R., 2012. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 1.-8. Ergänzungslieferung, VDLUFA Methodenbuch Band III, VDLUFA-Verlag Darmstadt
- Nery, J., Goudez, R., Biourge, V., Tournier, C., Leray, V., Martin, L., Thorin, C., Nguyen, P., Dumon, H., 2012. Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. Journal of Animal Science 90 (8), 2570-2580.
- Nilsson, U., Björck, I., 1988. Availability of Cereal Fructans and Inulin in the Rat Intestinal Tract. Journal of Nutrition 118 (12), 1482-1486.
- Niness, K.R., 1999. Inulin and Oligofructose: What Are They? Journal of Nutrition 129 (S7), 1402S-1406S.
- Nisman, B., 1954. The stickland reaction. Bacteriological Reviews 18 (1), 16-42.
- Okey, R., 1919. Studies on the behavior of inulin in the animal body. II. Inulin in the alimentary canal. Journal of Biological Chemistry 39 (1), 149-162.
- Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., Cheeke, P., 2001a. Resveratrol and Other Phenolics from the Bark of *Yucca schidigera* Roezl. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (2), 747-752.

- Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., Cheeke, P., 2001b. Steroidal Saponins of *Yucca schidigera* Roetzl. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (9), 4392-4396.
- Paßlack, N., Al-Samman, M., Vahjen, W., Männer, K., Zentek, J., 2012. Chain length of inulin affects its degradation and the microbiota in the gastrointestinal tract of weaned piglets after a short-term dietary application. Livestock Science 149 (1-2), 128-136.
- Patra, A.K., Stiverson, J., Yu, Z., 2012. Effects of quillaja and yucca saponins on communities and select populations of rumen bacteria and archaea, and fermentation *in vitro*. Journal of Applied Microbiology 113 (6), 1329-1340.
- Patra, A.K., 2011. Responses of feeding prebiotics on nutrient digestibility, faecal microbiota composition and short-chain fatty acid concentrations in dogs: a meta-analysis. Animal 5 (11), 1743-1750.
- Paulo, L., Oleastro, M., Gallardo, E., Queiroz, J.A., Domingues, F., 2011. Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. Food Research International 44 (4), 964-969.
- Payne, A.N., Zihler, A., Chassard, C., Lacroix, C., 2012. Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. Trends in Biotechnology 30 (1), 17-25.
- Piacente, S., Bifulco, G., Pizza, C., Stochmal, A., Oleszek, W., 2002. A novel phenolic spiro derivative, Yuccaone A, from *Yucca schidigera* bark. Tetrahedron Letters 43 (50), 9133-9136.
- Piacente, S., Pizza, C., Oleszek, W., 2005. Saponins and Phenolics of *Yucca schidigera* Roetzl: Chemistry and Bioactivity. Phytochemistry Reviews 4 (2-3), 177-190.
- Pieper, R., Tudela, C.V., Taciak, M., Bindelle, J., Perez, J.F., Zentek, J., 2016. Health relevance of intestinal protein fermentation in young pigs. Animal Health Research Reviews 17 (2), 137-147.
- Pietrzak, T., 1997. Verträglichkeit eiweißreicher Futtermittel beim Hund und Effekte auf einige Parameter mikrobieller Aktivität im Intestinaltrakt unter besonderer Berücksichtigung der Polyamine. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Pietrzak, T., Schad, A., Zentek, J., Mosenthin, R., 2002. Biogene Amine in der Tierernährung: Entstehung, Stoffwechsel und physiologische Aspekte. Übersichten zur Tierernährung 31, 37-64.
- Pinna, C., Vecchiato, C.G., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Stefanelli, C., Grandi, M., Gatta, P.P., Biagi, G., 2017. An *in vitro* evaluation of the effects of a *Yucca schidigera*

- extract and chestnut tannins on composition and metabolic profiles of canine and feline faecal microbiota. *Archives of Animal Nutrition* 71 (5), 395-412.
- Pinna, C., Vecchiato, C.G., Zaghini, G., Grandi, M., Nannoni, E., Stefanelli, C., Biagi, G., 2016. In vitro influence of dietary protein and fructooligosaccharides on metabolism of canine fecal microbiota. *BMC Veterinary Research* 12, 53, 1-9.
- Propst, E.L., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Merchen, N.R., Fahey G.C. Jr., 2003. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. *Journal of Animal Science* 81 (12), 3057-3066.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C., 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Veterinary Microbiology* 92 (1-2), 111-119.
- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L., Palva, A., 2004. Development of an extensive set of 16s rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 97 (6), 1166-1177.
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., De Vuyst, L., 2016. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *frontiers in Microbiology* 7, 979, 1-21.
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck A.M., Meheust, A., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* 104 (S2), S1-S63.
- Roberfroid, M.B., 2005. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition* 93 (S1), S13-S25.
- Roberfroid, M.B., van Loo, J.A.E., Gibson, G.R., 1998. The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products. *Journal of Nutrition* 128 (1), 11-19.
- Rochus, K., Janssens, G.P., Hesta, M., 2014. Dietary fibre and the importance of the gut microbiota in feline nutrition: a review. *Nutrition Research Reviews* 27 (2), 295-307.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D., 2005. Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (10), 6150-6158.

- Santos, J.P.F., Saad, F.M.D.O.B., Ogoshi, R.C.S., Reis, J.S.D., Ferreira, L.G., Pires, C.P., França, J., Ebina, F.S., Aquino, A.A., Brunetto, M.A., 2016. Inclusion of *Yucca schidigera* extract and zeolite in the diet and its relationship to the apparent digestibility of nutrients and urinary pH in adult dogs. *Ciência Rural* 46 (8), 1456-1459.
- Santos, J.P.F., Saad, F.M.D.O.B., Maia, G.V.C., Pires, C.P., Reis, J.S., Roque, N.C., Aquino, A.A., Brunetto, M.A., 2013. Inclusion of *Yucca schidigera* and zeolite in dog feed: Influence on mineral excretion. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65 (3), 918-926.
- Seiler, N., Raul, F., 2007. Polyamines and the Intestinal Tract. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 44 (4), 365-411.
- Sen, S., Makkar, H.P., Muetzel, S., Becker, K., 1998. Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 27 (1), 35-38.
- Siavoshian, S., Blottière HM, Le Foll, E.L., Kaeffer, B., Cherbut, C., Galmiche, J.P., 1997. Comparison of the effect of different short chain fatty acids on the growth and differentiation of human colonic carcinoma cell lines *in vitro*. *Cell Biology International* 21 (5), 281-287.
- Simpson, J.M., Martineau, B., Jones, W.E., Ballam, J.M., Mackie, R.I., 2002. Characterization of Fecal Bacterial Populations in Canines: Effects of Age, Breed and Dietary Fiber. *Microbial ecology* 44 (2), 186-197.
- Singh, R.S., Singh, R.P., 2010. Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential. *Food Technology and Biotechnology* 48 (4), 435-450.
- Slezak, K., Hanske, L., Loh, G., Blaut, M., 2013. Increased bacterial putrescine has no impact on gut morphology and physiology in gnotobiotic adolescent mice. *Beneficial Microbes* 4 (3), 253-266.
- Soergel, K.H., 1994. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *The clinical investigator* 72 (10), 742-748.
- Song, Y., Liu, C., Finegold, S.M., 2004. Real-time PCR Quantitation of Clostridia in Feces of Autistic Children. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (11), 6459-6465.
- Stein, J., 2006. Meteorismus und Flatulenz. In: *Funktionsdiagnostik in der Gastroenterologie*. 2., aktualisierte Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 231-240.
- Stevenson, A., Buchanan, C.J., Abia, R., Eastwood, M.A., 1997. A Simple *In Vitro* Fermentation System for Polysaccharides—The Effects of Fermenter Fluid Surface

- Area/Fluid Volume Ratio and Amount of Substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73 (1), 101-105.
- Strickling, J.A., Harmon, D.L., Dawson, K.A., Gross, K.L., 2000. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: Influences on nutrient digestion and microbial populations. *Animal Feed Science and Technology* 86 (3-4), 205-219.
- Strompfová, V., Marciňáková, M., Simonová, M., Bogovič-Matijašić, B., Lauková, A., 2006. Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Anaerobe* 12, 75-79.
- Stroucken, W.P., van der Poel, A.F., Kappert, H.J., Beynen, A.C., 1996. Extruding vs Pelleting of a Feed Mixture Lowers Apparent Nitrogen Digestibility in Dogs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71 (4), 520-522.
- Suchodolski, J.S., Camacho, J., Steiner, J.M., 2008. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16s rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 66 (3), 567-578.
- Suchodolski, J.S., Dowd, S.E., Westermarck, E., Steiner, J.M., Wolcott, R.D., Spillmann, T., Harmoinen, J.A., 2009. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16s rRNA gene sequencing. *BMC microbiology* 9 (210), 1-16.
- Suchodolski, J.S., Riaux, C.G., Steiner, J.M., Fetz, K., Williams, D.A., 2005. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *American Journal of Veterinary Research* 66 (9), 1556-1562.
- Suchodolski, J.S., Xenoulis, P.G., Paddock, C.G., Steiner, J.M., Jergens, A.E., 2010. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology* 142 (3-4), 394-400.
- Sunvold, G.D., Hussein, H.S., Fahey, G.C. Jr., Merchen, N.R., Reinhart, G.A., 1995a. In Vitro Fermentation of Cellulose, Beet Pulp, Citrus Pulp, and Citrus Pectin Using Fecal Inoculum from Cats, Dogs, Horses, Humans, and Pigs and Ruminal Fluid from Cattle. *Journal of Animal Science* 73 (12), 3639-3648.
- Sunvold, G.D., Fahey, G.C. Jr., Merchen, N.R., Reinhart, G.A., 1995b. In Vitro Fermentation of Selected Fibrous Substrates by Dog and Cat Fecal Inoculum: Influence of Diet Composition on Substrate Organic Matter Disappearance and Short-Chain Fatty Acid Production. *Journal of Animal Science* 73 (4), 1110-1122.
- Sunvold, G.D., Fahey, G.C. Jr., Merchen, N.R., Titgemeyer, E.C., Bourquin, L.D., Bauer, L.L., Reinhart, G.A., 1995c. Dietary Fiber for Dogs: IV. In vitro Fermentation of

- Selected Fiber Sources by Dog Fecal Inoculum and In Vivo Digestion and Metabolism of Fiber-supplemented Diets. *Journal of Animal Science* 73 (4), 1099-1109.
- Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Healy, H.P., Dawson, K.A., Merchen, N.R., Fahey, G.C. Jr., 2002. Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanooligosaccharides Influence Immune Function, Ileal and Total Tract Nutrient Digestibilities, Microbial Populations and Concentrations of Protein Catabolites in the Large Bowel of Dogs. *Journal of Nutrition* 132 (5), 980-989.
- Tran, Q.D., Hendriks, W.H., van der Poel, A.F., 2008. Effects of extrusion processing on nutrients in dry pet food. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (9), 1487-1493.
- Untawale, G.G., Pietraszek, A., McGinnis, J., 1978. Effect of Diet on Adhesion and Invasion of Microflora in the Intestinal Mucosa of Chicks. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 159 (2), 276-280.
- Vanhoutte, T., Huys, G., De Brandt, E., Fahey, G.C. Jr., Swings, J., 2005. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiology Letters* 249 (1), 65-71.
- Verlinden, A., Hesta, M., Hermans, J.M., Janssens, G.P., 2006. The effects of inulin supplementation of diets with or without hydrolysed protein sources on digestibility, faecal characteristics, haematology and immunoglobulins in dogs. *British Journal of Nutrition* 96 (5), 936-944.
- Vickers, R.J., Sunvold, G.D., Kelley, R.L., Reinhart, G.A., 2001. Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora. *American Journal of Veterinary Research* 62 (4), 609-615.
- Wallace, R.J., Arthaud, L., Newbold, C.J., 1994. Influence of *Yucca Shidigera* Extract on Ruminal Ammonia Concentrations and Ruminal Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (6), 1762-1767.
- Wang, X., Gibson, G.R., 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Microbiology* 75 (4), 373-380.
- Watzl, B., Girrbaach, S., Roller, M., 2005. Inulin, oligofructose and immunomodulation. *British Journal of Nutrition* 93 (S1), S49-S55.
- Weber, M., Kleim, L., Feugier, A., Biourge, V., 2016. Poster 8. Impact of saponin extracts from *Yucca Shidigera* and *Quillaia* on coprophagia and faecal parameters in dogs. In: *Proceedings of WALTHAM International Nutritional Sciences Symposium* 127-128.

- 
- Weber, M., Martin, L., Biourge, V., Nguyen, P., Dumon, H., 2003. Influence of age and body size on the digestibility of a dry expanded diet in dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87 (1-2), 21-31.
- Weese, J.S., Anderson, M.E., 2002. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *Canadian Veterinary Journal* 43 (10), 771-774.
- Weiß, M., 2003. Wirkung von *Enterococcus faecium* auf den Organismus neonataler Hundewelpen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Willing, B.P., van Kessel, A.G., 2010. Host pathways for recognition: Establishing gastrointestinal microbiota as relevant in animal health and nutrition. *Livestock Science* 133 (1-3), 82-91.
- Xenoulis, P.G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J.M., van House, A.M., Suchodolski, J.S., 2008. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS microbiology ecology* 66 (3), 579-589.
- Yamka, R.M., Jamikorn, U., True, A.D., Harmon, D.L., 2003. Evaluation of low-ash poultry meal as a protein source in canine foods. *Journal of Animal Science* 81 (9), 2279-2284.
- Yasuda, K., Maiorano, R., Welch, R.M., Miller, D.D., Lei, X.G., 2007. Cecum Is the Major Degradation Site of Ingested Inulin in Young Pigs. *Journal of Nutrition* 137 (11), 2399-2404.
- Zaharia, V., Varzescu, M., Djavadi, I., Newman, E., Egnor, R.W., Alexander-Chacko, J., Charney, A.N., 2001. Effects of short chain fatty acids on colonic Na<sup>+</sup> absorption and enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 128 (2), 335-347.
- Zentek, J., 1995a. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastrointestinal tract of dogs. I. Effects of varying protein intake on the composition of the ileum chyme and the faeces. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 74 (1-5), 43-52.
- Zentek, J., 1995b. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastrointestinal tract of dogs. II. Effects on the microflora in the ileum chyme. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 74 (1-5), 53-61.
- Zentek, J., 1995c. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastrointestinal tract of dogs. III. *In vitro* studies on the metabolic activities of the small-intestinal microflora. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 74 (1-5), 62-73.

- Zentek, J., 2000. Bakterienflora des caninen Intestinaltrakts; Physiologie, Fütterungseinflüsse und diätetische Konsequenzen. *Kleintierpraxis* 45 (7), 523–534.
- Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., Ballèvre O., RoCHAT, F., 2003. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87 (11-12), 397-407.
- Zentek, J., Molitor, D., Kamphues, J., 1998a. Prüfung intestinaler Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) bei Hunden. *Kleintierpraxis* 43, 187-197.
- Zentek, J., van der Steen, I., Rohde, J., Amtsberg, G., 1998b. Dietary effects on the occurrence and enterotoxin production of *Clostridium perfringens* in the canine gastrointestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 80 (1-5), 250-252.
- Zentek, J., Fricke, S., Hewicker-Trautwein, M., Ehinger, B., Amtsberg, G., Baums, C., 2004. Dietary Protein Source and Manufacturing Processes Affect Macronutrient Digestibility, Fecal Consistency, and Presence of Fecal *Clostridium perfringens* in Adult Dogs. *Journal of Nutrition* 134 (8), 2158S-2161S.
- Zentek, J., Kaufmann, D., Pietrzak, T., 2002. Digestibility and Effects on Fecal Quality of Mixed Diets with Various Hydrocolloid and Water Contents in Three Breeds of Dogs. *Journal of Nutrition* 132 (6), 1679S–1681S.

## 9 Anhang

Tabelle 18: Zusammensetzung der Versuchstierpopulation

Nummer	Name	Rasse	Alter	Geschlecht	Körpergewicht (kg)	Diät
1	Pongo	Beagle	3 J 10 M	männlich kastiert	15,6	A
2	Phoebe	Beagle	5 J 7 M	weiblich	14,6	A
3	Mia	Beagle	3 J 10 M	weiblich	10,5	B
4	Bonnie	Beagle	3 J 10 M	weiblich	9,90	B

Tabelle 19: Geräte und Chemikalien für die *in vitro* Fermentation

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Toppits Zipper® Allzweck-Beutel 3 l	Cofresco Frischhalteprodukte GmbH&Co. KG	Minden, Deutschland
BACTRON® anaerobic chamber Model BACTRON300-2 6.0A	Sheldon Manufacturing, Inc.	Cornelius, Oregon, USA
GOX 100 % O <sub>2</sub> Greisinger electronic	GHM Messtechnik GmbH	Regenstauf, Deutschland
Thermo Scientific MAXQ 6000 Model SHKE6000 - 1CE	Thermo Fisher Scientific Inc.	Dubuque, Iowa, USA
Afnor-Schraubflaschen, Stopfen und Kappen 125 ml Klinger	Zscheile & Klinger GmbH	Hamburg, Deutschland
L-Cysteinhydrochlorid Monohydrat ≥ 99 %, CELLPURE®	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 99 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Di-Kaliumhydrogenphosphat ≥ 99 %, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid ≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat ≥ 99 %, p.a., ACS (CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O)	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat z.A.	E. Merck	Darmstadt, Deutschland
Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Rotilab® Magnetic stirrer with heater MH 15	Velp Scientifica Srl	Usmate Velate, Italien
Formiergas	Linde AG	Berlin, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Laboklav 55-195	SHP Steriltechnik AG	Satuelle, Deutschland
Inulin, Orafti® SIPS, min 84 g/100g d.m. Inulin	Beneo-Orafti S.A.	Tienen, Belgien
<i>Yucca schidigera</i> , Natural Yucca powder mind. 8 % Saponinkonzentration	Worlée-Chemie GmbH	Hamburg, Deutschland
Acculab Atilon, Elektronische Analysen- und Präzisionswaage, Max 220 g d = 0,1 mg	Acculab sartorius group	Göttingen, Deutschland
Kern EMB 600-2 Präzisionswaage, Max 600 g d = 0,01 g	KERN & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Vortex V-1plus	BioSan SIA	Riga, Lettland
CELLSTAR® Tubes, Tubes 50 ml, PP, graduated, conical bottom with support skirt, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® Tubes, Tubes 50 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Reaction Tubes, 1,5 ml, PP, graduated, attached cap, natural	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Tubes® 5,0 ml, screw cap	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Frischhaltebox mit Silikondichtung Clip&Close 2,3 l	EMSA GmbH	Emsdetten, Deutschland
Kunststoffständer für 16 Eppendorfgefäße 5 ml 45° Winkel	Eigenbau Institut für Tierernährung FU Berlin	Berlin, Deutschland
Rotilabo® - Aluminiumfolie, Stärke 30 µm	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Thermo Scientific AnaeroGen™ 2,5 l Atmosphere Generation Systems	Manufactured for Oxoid Ltd. by Mitsubishi Gas Chemical Company Inc.	Japan
Eppendorf Centrifuge 5430	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
RNAlater™	Sigma Life Science	Steinheim, Deutschland
TruCool® Midi Ice Pan 4 l rectangular EVA-foam ice pan	BioCision LLC	Larkspur, Kalifornien, USA
Labor-Gefriergerät Lgex 3410 MediLinie, -9 °C bis -30 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach an der Riß, Deutschland

Tabelle 20: Geräte und Chemikalien für die pH-Messung

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
InLab <sup>®</sup> Micro, pH 0... 14, 0 ... 80 °C, Electrolyte 3 mol/l KCl	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
pH-Pufferlösung pH 4	Mettler Toledo AG, Process Analytics	Urdorf, Schweiz
pH-Pufferlösung pH 7	Mettler Toledo AG, Process Analytics	Urdorf, Schweiz
Safe-Lock Tube 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
TruCool <sup>®</sup> Midi Ice Pan 4 l rectangular EVA-foam ice pan	BioCision LLC	Larkspur, Kalifornien, USA

Tabelle 21: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von Ammonium

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Acculab Atilon, Elektronische Analysen- und Präzisionswaage, Max 220 g d = 0,1 mg	Acculab sartorius group	Göttingen, Deutschland
Ammoniumchlorid 99,995 Suprapur <sup>®</sup>	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
InLab <sup>®</sup> Routine Pro-ISM, pH 0... 14, 0 ... 100 °C, Electrolyte 3 mol/l KCl	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
pH-Pufferlösung pH 4	Mettler Toledo AG, Process Analytics	Urdorf, Schweiz
pH-Pufferlösung pH 7	Mettler Toledo AG, Process Analytics	Urdorf, Schweiz
MOPS Pufferan <sup>®</sup> (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure) ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypochloritlösung 12% Cl	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Phenol nitroprusside solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Microplate, 96 Well, U-Shape, 1 Ø PCS/BAG	Greiner Bio-One International GmbH	Monroe, North Carolina, USA
Microplate, 96 Well, PS, F-Bottom, clear	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Masterblock, 96 Well, PP, Ø 5 ml, V-Bottom, natural, sterile, single packed	Greiner Bio-One International GmbH	Monroe, North Carolina, USA
Safe-Lock Tube 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten-Photometer: TECAN Sunrise <sup>™</sup>	Tecan Österreich GmbH	Grödig, Österreich
XFluor <sup>™</sup>	Tecan Österreich GmbH	Grödig, Österreich
CELLSTAR <sup>®</sup> Tubes, Tubes 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Vortex V-1plus	BioSan SIA	Riga, Lettland
Rotilab <sup>®</sup> Magnetic stirrer with heater MH 15	Velp Scientifica S.r.l.	Scorze, Italien
TruCool <sup>®</sup> Midi Ice Pan 4 l rectangular EVA-foam ice pan	BioCision LLC	Larkspur, Kalifornien, USA

Tabelle 22: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von kurzkettigen und verzweigt-kettigen Fettsäuren

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Agilent Technologies 6890N, auto sampler G2614A, injection tower G2613A	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG	Böblingen, Deutschland
HP Chem Station Software	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG	Waldbronn, Deutschland
n-Hexan Rotisol <sup>®</sup> HPLC	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Supelco <sup>®</sup> Volatile Free Acid Mix (46975-U)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Oxalsäure ≥ 99 % (R.T.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Agilent P/N (5183-2037), Liner 1,8 mm	Agilent Technologies, Inc.	Mulgrave, Victoria, Australien
Säule HP-INNOWAX (19095N-123I) Length 30 m, Diam. 0,530 mm, Film 1,00 µm	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG	Böblingen, Deutschland
Long Life Non-Stick 11 mm Septa (5183-4761)	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA
Probengefäße cap, 11 mm, clear snap, PT FE/RS	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA
Vials N11, flach, Rollrand, 1,5 ml/ 11,6 x 32 mm, klar	Machery-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, New York, USA

Tabelle 23: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von D- und L-Laktat

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Analysewaage Typ A 200 S	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat-II-Trihydrat $\geq 99\%$ , p.a., ACS	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Kupfer-II-sulfat (wasserfrei)	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Zinkchlorid Technipur	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Bandelin Sonorex Super RK106	Bandelin electronic GmbH & Co.KG	Berlin, Deutschland
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Electron LED GmbH	Osterode am Harz, Deutschland
Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Safe-Lock Tube 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Cap, 11 mm, clear snap, PT FE/RS	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA
Vials N11, flach, Rollrand, 1,5 ml/ 11,6 x 32 mm, klar	Machery-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Deutschland
Vial insert, 250 $\mu$ l glass flat bottom	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA
HS-Einmalspritzen 3 ml Luer	Henry Schein Inc.	Melville, New York, USA
25 mm Spritzenvorsatzfilter w/ 0,45 $\mu$ m Zelluloseacetat Membran	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Agilent 1100 Series HPLC Value System	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG	Böblingen, Deutschland
Chromleon <sup>®</sup> Software Version 6.80	Dionex Corporation	Sunnyvale, Kalifornien, USA
SecurityGuard <sup>™</sup> Cartridges C 18 4,0 x 2,0 mm (Vorsäule)	Phenomenex Ltd.	Aschaffenburg, Deutschland
Chirex <sup>®</sup> 3126 (D)-penicillamine, LC Column 150 x 4,6 mm (Hauptsäule)	Phenomenex Ltd.	Aschaffenburg, Deutschland

Tabelle 24: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von biogenen Aminen

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Analysewaage Satorius Genius Modell ME235P	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Trichloressigsäure krist. Reinst	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
3,3,-Thiodipropionsäure zur Synthese	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Hexamethylenediamine dihydrochloride, 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
IKAMAG <sup>®</sup> RET	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG	Staufen, Deutschland
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Electron LED GmbH	Osterode am Harz, Deutschland
IKA <sup>®</sup> VORTEX 3, Modell V3 S000	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG	Staufen, Deutschland
Safe-Lock Tube 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Cap, 11 mm, clear snap, PT FE/RS	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA
Vials N11, flach, Rollrand, 1,5 ml/ 11,6 x 32 mm, klar	Machery-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Deutschland
HS-Einmalspritzen 3 ml Luer	Henry Schein Inc.	Melville, New York, USA
25 mm Spritzenvorsatzfilter w/ 0,45 µm Zelluloseacetat Membran	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Biochrom 30 amino acid analyser	Biochrom Ltd.	Cambridge, Großbritannien
Midas 830 HPLC Autosampler	Spark Holland	Emmen, Niederlande
PEEK-Trennsäule für biogene Amine, 10 x 4,0 (80-6002-56)	Biochrom Ltd.	Cambridge, Großbritannien
BioSys (Gerätesteuerung)	BIO-SYS GmbH	Karben, Deutschland
EZChrom Elite 3.3.2	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA

Tabelle 25: Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von Phenol- und Indolverbindungen

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Agilent 1100 Series HPLC Value System	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG	Böblingen, Deutschland
Chromeleon® Software Version 6.80	Dionex Corporation	Sunnyvale, Kalifornien, USA
Security Guard C18 4,0 x 2,0 mm (P/N AJ0-4286)	Phenomenex Ltd.	Aschaffenburg, Deutschland
Synergi Hydro-RP 4 µ 250 x 4,60 mm (P/N 00G-4375-E0)	Phenomenex Ltd.	Aschaffenburg, Deutschland
Cap, 11 mm, clear snap, PT FE/RS	Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
Vials N11, flach, Rollrand, 1,5 ml/ 11,6 x 32 mm, klar	Machery-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Deutschland
Salzsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
ortho-Phosphorsäure 85 %	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Indole ≥ 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Phenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
p-Cresol analytical standard	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
3-methylindol (M51458)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
4-Ethylphenol (E44205)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland

Tabelle 26: Geräte und Chemikalien für die DNA-Extraktion

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
RNAse Away <sup>®</sup>	Molecular BioProducts. Inc.	San Diego, Kalifornien, USA
Eppendorf Centrifuge 5430	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
RNAlater <sup>™</sup>	Sigma Life Science	Steinheim, Deutschland
Vortex V-1 plus	BioSan SIA	Riga, Lettland
FastPrep 2 ml Tube Lysing Matrix E	MP Biomedicals Germany GmbH	Eschwege, Deutschland
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA Kit (Columns with Collection Tubes, Collection Tubes (2 ml), Collection Tubes (1,5 ml), NucleoSpin <sup>®</sup> Filters, Lysis Buffer RA1)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Accu Block <sup>™</sup> Digital Dry Bath	Labnet International Inc.	Edison, New Jersey, USA
FastPrep-24 <sup>™</sup> 5 G Homogenizer	MP Biomedicals Germany, LLC	Santa Ana, Kalifornien, USA
Buffer DNA Wash	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Deutschland
Buffer DNA Elute	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Deutschland
Biomedical Freezer MDF-U333	Sanyo Electric Co., Ltd.	Osaka, Japan

Tabelle 27: Geräte und Chemikalien für die dsDNA-Konzentrationsbestimmung

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
RNAse Away <sup>®</sup>	Molecular BioProducts. Inc.	San Diego, Kalifornien, USA
UV Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Vortex V-1 plus	BioSan SIA	Riga, Lettland
Wasser, BioScience-Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Deoxyribonucleic acid from calf thymus	Sigma-Aldrich, Inc.	Saint Louis, Missouri, USA
Promega QuantiFluor <sup>®</sup> dsDNA System E2670	Promega Corporation	Madison, Wisconsin, USA
20X TE Buffer (pH 7.5)	Promega Corporation	Madison, Wisconsin, USA
Infinite <sup>®</sup> 200 Pro M Plex, Multi-mode microplate reader, Monochromator optics	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim, Deutschland
Tecan i-control Software	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim, Deutschland
Microplate, PS, 96 Well, F-Bottom (Chimney Well), Black, Fluotrac, Med. Binding	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml, farblos, DNA-, Dnase-, Rnasefrei	Biozym Scientific GmbH	Hess. Oldendorf, Deutschland
CELLSTAR <sup>®</sup> Tubes, Tubes 50 ml, PP, graduated, conical bottom with support skirt, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
DNA LoBind Tube 1,5 ml, Safe-Lock Eppendorf Tubes <sup>®</sup>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
TruCool <sup>®</sup> Midi Ice Pan 4 l rectangular EVA-foam ice pan	BioCision LLC	Larkspur, Kalifornien, USA

Tabelle 28: Geräte und Chemikalien für die qPCR

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
RNAse Away <sup>®</sup>	Molecular BioProducts. Inc.	San Diego, Kalifornien, USA
UV Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Microcentrifuge Tubes 2 ml	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
DNA LoBind Tube 1,5 ml, Safe-Lock Eppendorf Tubes <sup>®</sup>	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Vortex V-1 plus	BioSan SIA	Riga, Lettland
Wasser, BioScience-Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Brilliant II SYBR <sup>®</sup> Green QRT-PCR Master Mix with low ROX Kit 1-Step PCR Primer	Agilent Technologies, Inc.	Cedar Creek, Texas, USA
	Eurofins Genomics	Ebersberg, Deutschland
PCR Produkte	Eigenherstellung Institut für Tierernährung FU Berlin	Berlin, Deutschland
IKA <sup>®</sup> mini G	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG	Staufen, Deutschland
Optical Cap, 8x Strips	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA
Optical Tube, 8x Stripes	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA
TruCool <sup>®</sup> Midi Ice Pan 4 l rectangular EVA-foam ice pan	BioCision LLC	Larkspur, Kalifornien, USA
Agilent Technologies Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA

Tabelle 29: Zusammensetzung, Rohnährstoffgehalte und metabolisierbare Energie der Versuchsdiäten mit einem niedrigen Rohproteingehalt (Diät A) und hohem Rohproteingehalt (Diät B)

	Diät A	Diät B
Zusammensetzung, (g/kg uS)		
Reismehl	617	406
Geflügelmehl	87	239
Griebenmehl	67	168
Knochenmehl	19	2
Karottentrestler	108	110
Rapsöl	73	49
Titandioxid	2	2
Kaliumhydrogencarbonat	10	6
Vitamin- und Mineralprämix*	16	17
Rohnährstoffgehalte, (g/kg uS)		
Trockensubstanz	927	944
Rohprotein	201	377
Rohfett	93,2	98,7
Rohasche	51,9	54,7
Rohfaser	27,5	29,8
Umsetzbare Energie, (MJ/kg uS)*	15,1	15,7

\*Liefert pro kg Diät A (in Klammern Diät B): 9.600 (10.200) IE Vitamin A, 1.920 (2.040) IE Vitamin D<sub>3</sub>, 128 (136) mg Vitamin E, 4,80 (5,10) mg Vitamin K<sub>3</sub>, 4,00 (4,25) mg Vitamin B<sub>1</sub>, 4,00 (4,25) mg Vitamin B<sub>2</sub>, 6,40 (6,80) mg Vitamin B<sub>6</sub>, 32,0 (34,0) µg Vitamin B<sub>12</sub>, 40,0 (42,5) mg Niacin, 1,60 (1,70) mg Folsäure, 400 (425) µg Biotin, 16,0 (17,0) mg Pantothenensäure (Calcium-D-Pantothenat), 1.280 (1.360) mg Cholinchlorid, 80,0 (85,0) mg Eisen (Eisen(II)-carbonat), 16,0 (17,0) mg Kupfer (Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat), 80,0 (85,0) mg Zink (Zinkoxid), 96,0 (102) mg Mangan (Mangan(II)-oxid), 0,72 (0,77) mg Jod (Kalziumjodat, wasserfrei), 0,56 (0,60) mg Selen (Natriumselenit); \*berechnet mit DIN EN 16967:2017-10; Die Ergebnisse stammen aus einer parallel durchgeführten Studie (Eisenhauer 2019)

Tabelle 30: Rohnährstoffgehalte in Kotproben von Hunden, die mit einem niedrigen Rohproteingehalt (Diät A) und einem hohen Rohproteingehalt (Diät B) gefüttert wurden

	Diät A			Diät B			
	Hund 1	Hund 2	MW <sup>▶</sup>	Hund 3	Hund 4	MW <sup>▶</sup>	SEM <sup>§</sup>
Zusammensetzung, (g/kg TS)							
Rohprotein	295	292	294	401	372	387	27,5
Rohfett	20,7	24,1	22,4	23,0	44,5	33,8	5,51
Rohasche	224	206	215	208	196	202	5,85
Rohfaser	146	146	146	138	142	140	1,94

▶MW = Mittelwert; §SEM = Standardfehler des Mittelwerts; Die Ergebnisse stammen aus einer parallel durchgeführten Studie (Eisenhauer 2019)

Tabelle 31: Relative Häufigkeit der dominierenden bakteriellen 16S rRNA-Sequenzen (dargestellt in Prozent der Gesamtsequenzen) in Kotproben von Hunden, die mit einem niedrigen Rohproteingehalt (Diät A) und einem hohen Rohproteingehalt (Diät B) gefüttert wurden

Genus (%)	Diät A			Diät B			SEM <sup>§</sup>
	Hund 1	Hund 2	MW <sup>▶</sup>	Hund 3	Hund 4	MW <sup>▶</sup>	
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,28	0,82	0,55	1,05	0,13	0,59	0,22
<i>Bacteroides</i>	23,1	8,19	15,7	23,1	9,69	16,4	4,10
<i>Bifidobacterium</i>	1,93	0,01	0,97	0,18	0,86	0,52	0,44
<i>Blautia</i>	1,04	11,0	6,02	2,79	2,27	2,53	2,27
<i>Butyricoccus</i>	0,09	0,14	0,12	0,30	0,10	0,20	0,05
<i>Butyrivibrio</i>	2,30	0,13	1,22	2,34	0,35	1,35	0,60
<i>Cellulosilyticum</i>	1,36	0,01	0,69	0,75	0,08	0,42	0,32
<i>Clostridium</i>	14,1	23,2	18,7	10,3	9,77	10,0	3,11
<i>Collinsella</i>	0,18	0,25	0,22	0,21	0,16	0,19	0,02
<i>Eubacterium</i>	2,76	2,58	2,67	5,91	4,93	5,42	0,82
<i>Faecalibacterium</i>	2,26	26,0	14,1	11,3	0,79	6,05	5,79
<i>Fusobacterium</i>	22,8	7,23	15,0	14,7	48,6	31,7	9,00
<i>Gordonibacter</i>	0,06	0,06	0,06	0,03	0,04	0,04	0,01
<i>Hespellia</i>	0,16	0,12	0,14	0,07	0,05	0,06	0,02
<i>Lachnospira</i>	2,00	0,53	1,27	1,56	0,30	0,93	0,41
<i>Lactobacillus</i>	3,17	0,01	1,59	1,54	1,97	1,76	0,65
<i>Megamonas</i>	0,54	1,46	1,00	0,19	1,25	0,72	0,30
<i>Phascolarctobacterium</i>	1,01	0,41	0,71	1,22	1,22	1,22	0,19
<i>Prevotella</i>	6,46	0,32	3,39	12,9	6,36	9,63	2,57
<i>Robinsoniella</i>	0,76	0,30	0,53	0,16	0,10	0,13	0,15
<i>Roseburia</i>	0,01	2,74	1,38	0,07	0,03	0,05	0,68
<i>Ruminococcus</i>	1,94	7,81	4,88	3,09	2,13	2,61	1,38
<i>Selenomonas</i>	0,59	2,83	1,71	0,20	1,98	1,09	0,61
unklassifizierte <i>Clostridiales</i>	0,96	0,52	0,74	1,04	0,33	0,69	0,17
unklassifizierte Bakterien und nicht in allen Hunden nachgewiesen	10,1	3,33	6,64	5,00	6,51	5,70	1,47

▶MW = Mittelwert; §SEM = Standardfehler des Mittelwerts; Die Ergebnisse stammen aus einer parallel durchgeführten Studie (Eisenhauer 2019)

## 10 Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgenden Zeitschriften veröffentlicht:

Luisa Vierbaum, Laura Eisenhauer, Wilfried Vahjen and Jürgen Zentek (2019)

*In vitro* evaluation of the effects of *Yucca schidigera* and inulin on the fermentation potential of the faecal microbiota of dogs fed diets with low or high protein concentrations. Archives of Animal Nutrition. 73 (5), 399-413. DOI: 10.1080/1745039X.2019.1616498.

Luisa Vierbaum, Jürgen Zentek (2019)

Ernährung von Hunden: Gutes Protein, schlechtes Protein, zu viel Protein, zu wenig Protein – Fakten und Fiktionen. Kleintierpraxis. 64 (10), 576-589. DOI: 10.2377/0023-2076-64-576.

## 11 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek für die Ermöglichung der Erstellung dieser Arbeit sowie die großartige Unterstützung. Es war mir eine große Ehre mit Ihnen meine Dissertation anfertigen zu dürfen und dabei fortlaufend von Ihnen lernen zu können.

Für die finanzielle Unterstützung und Ermutigung zu dieser Arbeit möchte ich mich bei der Firma RONDO FOOD GmbH & Co. KG, insbesondere bei Boris Terlinden, bedanken.

Bei Herrn Dr. Wilfried Vahjen bedanke ich mich herzlich für die besonders hilfreiche Beratung zur praktischen Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Laura Eisenhauer für die Zurverfügungstellung der von Ihr erhobenen Daten aus dem parallel durchgeführten Fütterungsversuch.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin für die große Hilfsbereitschaft bedanken. Eine besonders große Hilfe im Labor waren mir vor allem Łukasz Grzeškowiak, Eva Maria Saliu, Marita Eitinger, Katharina Topp und Luisa Ebersbach.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen lieben Freundinnen Katja Genfeld, Sandra Holtschoppen und Svenja Römer, die mich fortlaufend unterstützt haben und mir durch die schöne gemeinsame Zeit immer wieder neue Kraft gegeben haben. Sarah Plicht und Lisa Eggink danke ich für Ihre Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir unermüdlich mit ganzem Herz Unterstützung sowie Rückhalt gegeben haben und mir damit ermöglicht haben meinen Weg zu gehen!

## **12 Finanzierungsquellen**

Die vorliegende Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die Firma RONDO FOOD GmbH & Co. KG. Es besteht kein Interessenskonflikt durch die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

### **13 Selbstständigkeitserklärung**

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

Berlin, den 16.12.2019

Luisa Vierbaum









**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-031-8