

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

**Depektinisierte und integrale Mangoschalen
in der Ernährung von Broilern**

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

**vorgelegt von
Erin Lau
Tierärztin
aus Berlin**

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4021

**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: Prof. Dr. Reinhold Carle

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Diana Meemken

Deskriptoren nach CAB-Thesaurus: broilers, nutrition, poultry feeding, animal nutrition, feeds, plant products, Mangifera, digestion, polyphenols, pectins

Tag der Promotion: 28.02.2018

Inhalt

Inhalt.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Glossar.....	VIII
1. Einleitung.....	1
2. Literatur.....	2
2.1. Herkunft und Systematik der Mango.....	2
2.1.1. Produktion der Mango und Import nach Deutschland.....	2
2.2. Hauptnährstoffgehalte der Mango und ihrer Bestandteile.....	4
2.3. Sekundäre pflanzliche Inhaltsstoffe der Mango.....	6
2.4. Mangoreste als Futtermittel.....	10
2.5. Auswirkungen von Mangofütterung auf Hühner.....	11
2.5.1. Einfluss der Mangofütterung auf zootecnische Leistungen.....	11
2.5.2. Einfluss der Mangofütterung auf die Verdauungsphysiologie bei Hühnern.....	13
2.6. Besonderheiten von Pektinen in der Geflügelfütterung.....	16
2.7. Effekte von Polyphenolen und anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen bei Hühnern.....	17
2.8. Schlussfolgerung aus der Literaturübersicht.....	20
2.9. Ziel der Arbeit.....	20
3. Material und Methoden.....	22
3.1.1. Charakterisierung einer präbiotischen Wirkung mittels semi-kontinuierlichen Fermentationssystems.....	22
3.1.2. Charakterisierung von Adhäsionseffekten pflanzlicher Extrakte auf ausgewählte aviäre <i>E. coli</i>	25
3.2. Fütterungsversuche – Testung der Mangoschale als Futterzusatz bei Broilern.....	31
3.2.1. Tierexperimentelle Methoden.....	31
3.2.1.1. Versuchstiere: Haltung, Anzahl und Herkunft.....	31
3.2.1.2. Fütterung und Tränkeeinrichtungen.....	32

3.2.1.3.	Versuchsdurchführung.....	32
3.2.1.4.	Leistungsparameter	32
3.2.2.	Versuchsfutter und Fütterung	33
3.2.2.1.	Weender Analyse	35
3.2.2.2.	Analyse der Aminosäuregehalte	37
3.2.2.3.	Bestimmung der Mengenelemente.....	39
3.2.2.4.	Titanbestimmung	40
3.2.2.5.	Probenentnahmen	41
3.2.2.6.	Quantifizierung bakterieller Stoffwechselprodukte.....	42
3.2.2.6.1.	Messung des pH-Wertes in der Digesta	42
3.2.2.6.2.	Messung des Gehalts an Laktat in der Digesta	43
3.2.2.6.2.	Ammonium	44
3.2.2.6.3.	Kurzkettige Fettsäuren.....	44
3.2.2.7.	Quantitative Erfassung der Bakteriengruppen in der Digesta	45
3.2.3.	Tierexperimentelle Methoden zur Bestimmung der Verdaulichkeit.....	48
3.2.3.1.	Versuchstiere: Anzahl und Herkunft	48
3.3.3.4.	Probenentnahmen	48
3.3.3.4.	Probenentnahmen	48
3.3.2.5.	Weender- bzw. Rohnährstoffanalyse für die Bestimmung der präzäkalen Verdaulichkeit	48
3.2.4.	Statistik	49
4.	Ergebnisse.....	50
4.1.	In-vitro-Untersuchungen	50
4.1.1.	Charakterisierung einer präbiotischen Wirkung mittels semi-kontinuierlichen Fermentationssystems	50
4.1.2.	Charakterisierung von Adhäsionseffekten pflanzlicher Extrakte auf ausgewählte aviäre <i>E. coli</i>	51
4.2.	Fütterungsversuche.....	54
4.2.1.	Versuchsfutter und Fütterung	54
4.2.1.1.	Voruntersuchungen zur Eignung der Mangoschalen.....	54

4.2.2. Ergebnisse des Tierversuchs	56
4.2.2.1. Gesundheitsbeurteilung.....	56
4.2.2.2. Leistungsdaten	56
4.2.2.2. Laktatgehalte und pH-Wert in der Digesta.....	57
4.2.2.3. Ammoniumgehalt in der Digesta.....	58
4.2.2.4. Gehalte flüchtiger Fettsäuren in der Digesta	59
4.2.2.5. Quantitative Erfassung der Bakteriengruppen in der Digesta	61
4.2.2.6. Scheinbare präzäkale Aminosäurenverdaulichkeit.....	62
5. Diskussion.....	64
5.1. Charakterisierung einer präbiotischen Wirkung mittels semi-kontinuierlichen Fermentationssystems	64
5.2. Charakterisierung von Adhäsionseffekten pflanzlicher Extrakte auf ausgewählte aviäre <i>E. coli</i>	69
5.3. Diskussionen zu dem Fütterungsversuch	74
5.3.1. Diskussion zu der Mischgenauigkeit der Futtermischungen für den Fütterungsversuch.....	74
5.3.2. Diskussion zu den Versuchsbedingungen	75
5.3.3. Diskussion Fütterungsversuch.....	75
5.3.4. Diskussion scheinbare präzäkale Verdaulichkeit.....	82
6. Zusammenfassung.....	85
7. Summary	86
8. Literaturliste	88
Anhang	97
A.1. Herstellung von Arbeitslösungen für die Charakterisierung einer präbiotischen Wirkung mittels semi-kontinuierlichem Fermentationssystems	97
A.1.1. PRAS-Puffer (Prereduced Anaerobe Sterilized Medium).....	97
A.1.2. Herstellung der Arbeitslösungen für die Ammoniummessung.....	97
A.1.3. Kurzkettige Fettsäuren - Herstellung der Lösungen.....	98
A.2. Herstellung der Lösungen und verwendete Bakterienstämme für die Charakterisierung von Adhäsionseffekten pflanzlicher Extrakte auf ausgewählte aviäre <i>E. coli</i>	99
A.2.1. verwendete Bakterienstämme von <i>E. coli</i>	99

A.2.2. Herstellung der Arbeitslösungen für den Adhäsionsversuch.....	99
A.3. Daten zur Vorbereitung, Abbruchkriterien und Aufstallung während der Tierversuche	100
A.3.1. Abbruchkriterien	100
A.4. Versuchsprotokoll Tierversuch	104
A.4.1. Aufstallung Tiergruppen	106
A.4.2. Ergebnisse der Weender Analyse der Mangoschalen	108
A.4.3. Schwermetall- und Pestizidanalysen	109
A.4.4. Depektinisierungsvorgang.....	112
A.4.5. Oxidationslösung AS	112
A.4.6. Hydrolysenmischung AS	112
A.4.7. Herstellung des Citratpuffers für den Aminosäureaufschluss	113
A.4.8. Herstellung der Lösungen für die Phosphatbestimmung	113
A.4.9. Herstellung des Standards für die Titanbestimmung:	113
A.5. Herstellung und Aufbereitung der entnommenden Proben aus dem Tierversuch.....	114
A.5.1. Herstellung der Lösungen für die Laktatmessung:.....	114
A.5.2. Verwendete Primer: Laktobazillen, Enterobakterien und Chlostridien	115
A.5.3. Durchführung der DNA-Extraktion	115
A.5.4. Standard Kalbsthymusreihe	116
A.5.5. Verdünnung Hoechst Dye-Lösung	117
A.5.6. TNE Verdünnung für das NanoDrop-Gerät.....	117
A.5.7. Vorbereitung des Mastermixgemisches inkl. der spezifischen Primer	118
A.5.8. qPCR Messungszykluseinstellungen	118
Danksagung	
Finanzierungsquellen	121
Interessenskonflikte – Conflict of Interest.....	
Selbstständigkeitserklärung	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Import von Guaven, Mangofrüchten und Mangostanfrüchten nach Deutschland 2005-2015	3
Abb. 2: Prozentuale Anteile der reifen Mangofrucht, Sorte Tommy Atkins (De La Cruz Medina und García 2002)	4
Abb. 3: Beispiel einer Wachstumskurve für Mangopektin mit <i>E. coli</i> IMT 15146	26
Abb. 4: Durchführung Adhäsionsversuch	29
Abb. 5: Pipettierschema für den Adhäsionsversuch	30
Abb. 6: Randomisierte Aufstallung der fünf Fütterungsgruppen - Durchgang 1*	107
Abb. 7: Randomisierte Aufstallung der fünf Fütterungsgruppen - Durchgang 2*2	107

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gehalt der Hauptnährstoffe in verschiedenen Fruchtanteilen der reifen Mangofrucht (in % TM), Sorte Tommy Atkins	5
Tab. 2: Gehalt der Hauptnährstoffe in verschiedenen Fruchtanteilen der reifen Mangofrucht (in % TM).....	5
Tab. 3: Mineralstoffgehalte in Mangoprodukten in mg/kg TS	6
Tab. 4: Polyphenolfractionen von verschiedenen Mangoschalen	9
Tab. 5: Komponenten (in %) der Alleinfuttermittel für Broiler.....	34
Tab. 6: Probenplan für die mikrobiologischen Untersuchungen (qPCR)	42
Tab. 7: Probenplan* für Messung der Metabolite	42
Tab. 8: Herstellung der Probenverdünnungen zur Laktatmessung	43
Tab. 9: Mischverhältnisse zur Messung von Ammonium.....	44
Tab. 10: Mischtablette für die Auswertung der flüchtigen Fettsäuren	45
Tab. 11: Mischtablette für Analyse der DNA- Gehalte in µl.....	46
Tab. 12: Gehalt an DNA für Messung der qPCR	47
Tab. 13: Mittlere Werte der Metaboliten der Kurzzeitinkubation mit den fünf Testsubstanzen und von Broilern stammendem Zäkuminhalt als Inokulum (Mittelwert ± Standardabweichung)	51
Tab. 14: Mittlere bakterielle Wachstumsparameter (MW±Standardabweichung.) der Adhäsionsversuche	53
Tab. 15: Analysierter Nährstoffgehalt in den Diäten	55
Tab. 16: Einfluss der Fütterung von Mangoschalen auf die Leistung von Broilern.....	57
Tab. 17: pH-Werte, L- und D-Laktat-Gehalt (µmol/g Digesta) im Kropf und den untersuchten Digestaprobe der fünf Fütterungsgruppen (Mittelwert (±Standardabweichung)).....	58
Tab. 18: Ammoniumkonzentrationen (µmol/g) im Kropf und in den Digestaprobe der fünf Fütterungsgruppen (Mittelwert(±Standardabweichung)	59
Tab. 19: Gehalte an flüchtigen Fettsäuren (µmol/g frische Digesta) im Kropf und in den verschiedenen Darmabschnitten der fünf Fütterungsgruppen (Mittelwert (±Standardabweichung))	60
Tab. 20: Mittlere bakterielle Zusammensetzung (log Kopien/g frischer Digesta) verschiedener Bakteriengruppen der fünf Fütterungsgruppen (Mittelwert (±Standardabweichung))	61
Tab.21: Zusammensetzung des PRAS-Puffers	97
Tab. 22: Verwendete Bakterienkulturen/Stämme von <i>E. coli</i> und Eigenschaften	99
Tab. 23: Abbruchkriterien Tierversuch – Teil 1	101
Tab. 24: Liste mit Abbruchkriterien (gemäß Arbeitskreis Tierschutzbeauftragter) - Teil 2.....	103

Tab. 25: Versuchsprotokoll, Anlage zum Genehmigungsantrag des Tierversuchs.....	105
Tab. 26: Ergebnisse der Analysen des Ausgangsmaterials.....	108
Tab. 27: Pipettierschema Standardreihe für die Titanbestimmung.....	114
Tab. 28: verwendete Primer für die qPCR.....	115
Tab. 29: Kalibrierreihe Kalbsthymus-DNA von 75 bis 1500 ng/ml.....	117
Tab. 30: Reaktionsbedingungen und qPCR-Parameter	118

Glossar

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ADF	Acid detergent fiber
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATC	Automatische Temperaturkontrolle
BSA	Bovines Serum Albumin
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
Elisa	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
Xg	Erdbeschleunigung
GAE	Gallus-Säure-Equivalente
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ISTD	Interne Standardlösung für flüchtige Fettsäuren
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
mM	Millimolar
Mmol	Millimol
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NDF	Neutral detergent fiber
NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharide
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pH	potentia hydrogenii
PRAS	Prereduced anaerobe sterilised Medium
p-Wert	Ergebnis des statistischen Signifikanztests
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
R*	freies Radikal

Ra	Rohasche
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Enzym zur Zersetzung der Ribonukleinsäure
Rp	Rohprotein
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren
SGS Institut Fresenius GmbH	Société Générale de Surveillance Holding Institut Fresenius, Gesellschaft mit beschränkter Haftung
spp.	Spezies
SSF	Solid State Fermentation
Stabw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen
TNE-Puffer	Tris-NaCl-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
VD Lufa	Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
STD	Standard
PW1-16	Probenwert
PLW1-16	Probenleerwert
RLW	Reagenzienleerwert
VM	Verdünnungsmedium
cv.	Kultivar

1. Einleitung

Die Mangofrucht und daraus hergestellte Produkte nehmen im Spektrum der importierten Früchte in Deutschland eine wichtige Rolle ein. Die Importvolumina sind in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen, von 57.800 t im Jahr 2011 auf 66.830 t im Jahr 2015, wobei in der Statistik auch Mangostanfrüchte und Guaven in geringem Umfang enthalten sind (Statista 2016). Die nach der Verarbeitung anfallenden Nebenprodukte finden derzeit keine Verwendung und belaufen sich Studien zufolge auf 23.390 – 39.780 t (2015) pro Jahr mit steigender Tendenz (Larrauri et al. 1996, Statista 2016). Da in diversen Studien gezeigt werden konnte, dass die Inhaltsstoffe der bisher nicht ausreichend verwerteten Mangoschalen gesundheitsförderliche, z. B. antimikrobielle und antioxidative Eigenschaften haben, erscheint dieser Aspekt auch für die Tiergesundheit relevant.

Eine der interessantesten Komponenten stellt das Pektin dar. Pektine finden in der Industrie Verwendung als Gelmittel und beeinflussen als unverdauliche Kohlenhydrate den Stoffwechsel der Mikrobiota im Dickdarm. Studien an Legehennen zeigten, dass Pektine als Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) jedoch auch negative Einflüsse auf die Leistung von Hühnern haben können (Langhout und Schutte 1996, Langhout et al. 1999). Nach dem aktuellen Stand in der Literatur existieren wenige Arbeiten, in denen Mangokerne und Schalen in der Geflügelernährung eingesetzt wurden. Die Auswirkungen der Mangoschalenfütterung auf die Verdauungsphysiologie und Beeinflussung der Mikrobiota wurde bisher nie im Zusammenhang mit der Tierleistung betrachtet. Es bestehen Lücken in der Literatur, was die präzäkale Nährstoffverdaulichkeit als auch den Einfluss auf die mikrobielle Besiedlung des Darms von Broilern nach der Fütterung von Mangoschalen in niedrigen Konzentrationen (1 und 2 %) angeht.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Mangoschalen als Futterkomponente bei Broilern auf die Leistung, verdauungsphysiologische Parameter und die intestinale Mikrobiota zu ermitteln. Durch die Testung von Mangoschalen und Mangopektin mittels In-vitro-Verfahren sollten Einflüsse auf die Produktion bakterieller Metaboliten im Vergleich mit Apfelpektin ermittelt werden. Die Wirkungen auf verschiedene *Escherichia coli*-Stämme aviärer Herkunft wurden ebenfalls in-vitro geprüft.

2. Literatur

2.1. Herkunft und Systematik der Mango

Die Familie der Sumachgewächse (*Anacardiaceae*) stammt ursprünglich aus der Gegend zwischen Indien, Myanmar und Bangladesch. Sie besteht aus 70 Gattungen mit 985 Arten. Zu dem Genus *Mangifera* L. werden bisher ca. 1000 Sorten gezählt (Bresinsky et al. 2008). Die wichtigsten Sorten für den weltweiten Handel sind Haden, Tommy Atkins, Kent und Keitt (De La Cruz Medina und García 2002). Die Sorten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe, Form, Farbe, Geruch, Geschmack, Erntezeit und einiger weiterer Eigenschaften. Der Reifegrad und die klimatischen Bedingungen während des Wachstums haben einen großen Einfluss auf den Gehalt der verschiedenen Inhaltsstoffe. Die Mango hat die größte wirtschaftliche Bedeutung innerhalb der *Anacardiaceae*.

Die systematische Zuordnung der Mango ist nachfolgend dargestellt (IUCN 1998):

Systematik

Stamm: *Magnoliophyta*
Klasse: *Magnoliopsida*
Ordnung: *Sapindales* (Seifenbaumartige)
Familie: *Anacardiaceae* (Sumachgewächse)
Genus: *Mangifera* L.
Spezies: *Mangifera indica* L. (Mango)

2.1.1. Produktion der Mango und Import nach Deutschland

Die nationale Jahreseinfuhrstatistik des Bundesamts für Ernährung und Landwirtschaft gibt Aufschluss über die jährlichen Importe von Mangos nach Deutschland, zusammen mit Guaven und Mangostanfrüchten. Da die Mango den Großteil dieser Importe ausmacht, sind diese Zahlen für die Interpretation der Entwicklung der Mangoimporte innerhalb Deutschlands nutzbar.

In Deutschland steigen die Zahlen der Mangofruchtimporte von 2005 mit einem Importvolumen von 39.190 t bis 2015 auf ein Gesamtimportvolumen von 66.282 t kontinuierlich an. Gründe für einen zeitweiligen Rückgang der Importe für 2009 und 2012 konnten nicht ermittelt werden, jedoch kam es 2014 zu einem kompletten Importstopp von reifen Mangos aus Indien während der gesamten Saison von März 2014 bis März 2015 aufgrund nicht erfüllter Qualitätsstandards

im vorangegangenen Jahr, da hier ein vermehrter Schädlingsbefall aufgetreten war (EU-Aktuell 2015). Einen Überblick über die Entwicklung der Importvolumen in Tonnen (t) nach Deutschland in den Jahren 2004 bis 2015 gibt folgende Grafik (Abbildung 1):

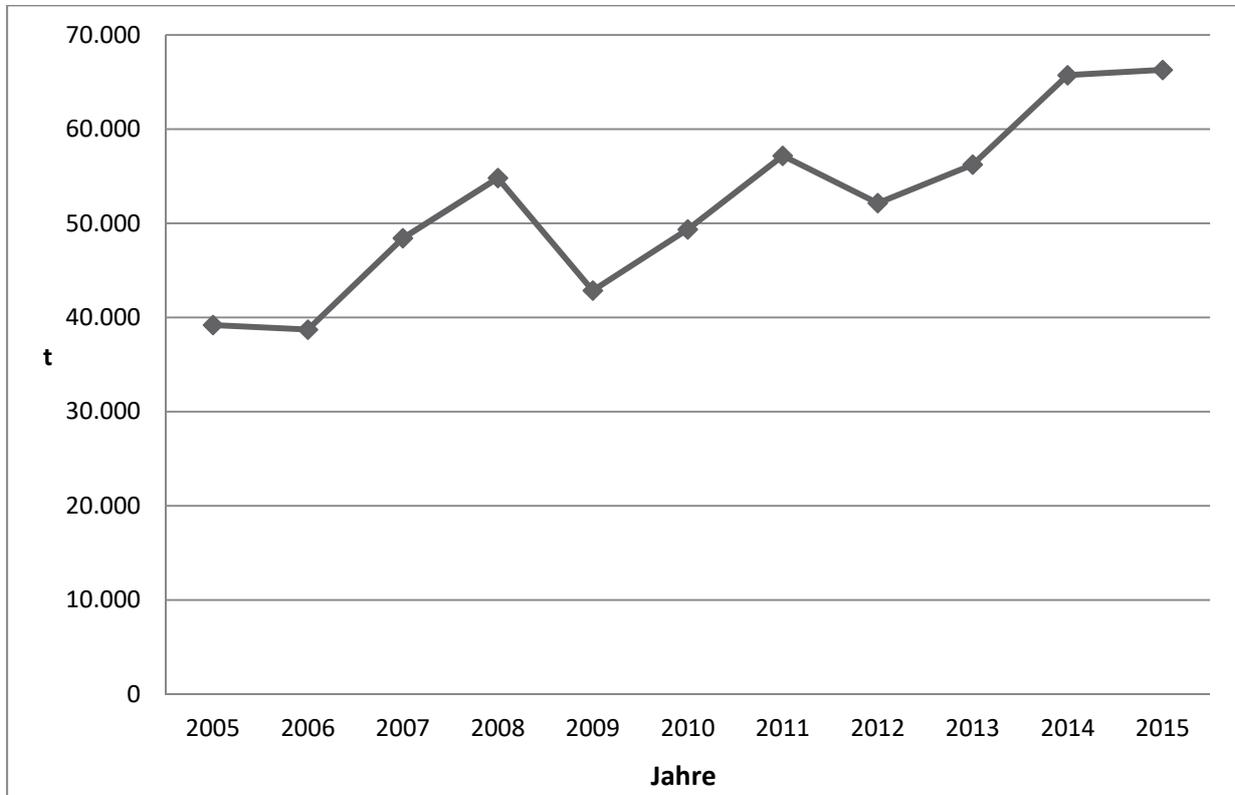


Abb. 1: Import von Guaven, Mangofrüchten und Mangostanfrüchten nach Deutschland 2005-2015

Erstellt auf Grundlage der Daten aus der nationalen Jahreseinfuhrstatistik (BMELV 2008, 2011, 2016)

Nur ein geringer Teil der aktuell importierten Mangos stammen aus Ländern der EU. In Spanien (3.305 t in 2015), Italien (799 t in 2015) und Frankreich (365 t in 2015) wurden vergleichsweise wenige Mangos produziert und hauptsächlich auf regionalen Märkten gehandelt. Die europäische Mangoproduktion konnte in den Jahren 2005 von 504 t bis 2015 auf 4.531 t um das Neunfache ausgedehnt werden. Bezogen auf die Gesamtmenge aller Importe stammt das Hauptvolumen von 62.297 t im Jahr 2015 aus Drittländern, vorwiegend aus Ländern in Südamerika, Afrika und Asien.

2.2. Hauptnährstoffgehalte der Mango und ihrer Bestandteile

Bei der Mango handelt es sich um eine Steinfrucht mit großen Variationen in Größe, Farbe und Geschmack. Sie setzt sich aus gelbem Fruchtfleisch, das eine unterschiedliche Textur aufweist, einem Kern und der Schale zusammen. Der Kern ist ovoid bis länglich und ummantelt von einem festen, verdichteten und faserigen Endokarp. Der Wassergehalt des Fruchtfleischs liegt mit ca. 82 % relativ hoch. Um einen Verderb hierdurch vorzubeugen, ist eine korrekte Lagerung bzw. Aufbereitung der Früchte notwendig.

Im Detail entfallen beispielsweise bei der beliebten Tommy Atkins-Mango Gewichtsanteile von 79,5 % auf das Fruchtfleisch, 12 % auf die Schale und 8,5 % auf den Kern (De La Cruz Medina und García 2002).

Der Kern enthält den protein- und kohlenhydratreichen Samen. Das Verhältnis von den Fruchtanteilen zueinander ist grafisch in Abbildung 2 dargestellt.

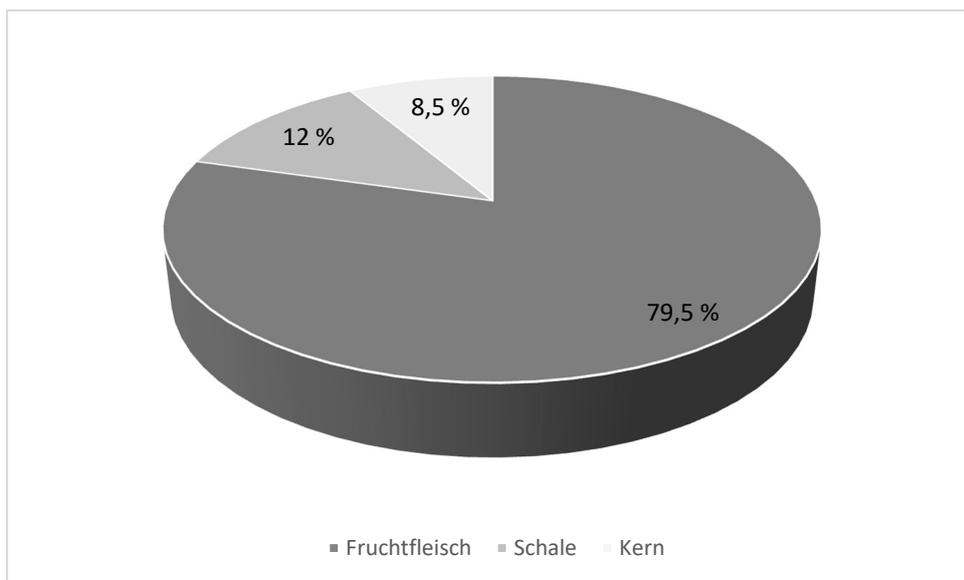


Abb. 2: Prozentuale Anteile der reifen Mangofrucht, Sorte Tommy Atkins (De La Cruz Medina und García 2002)

Daten zur genaueren Analyse der Faserfraktionen NDF und ADF liegen für Schale, Fruchtfleisch und Kerne von reifen Früchten der Tommy Atkins Mango aus Mexiko vor. Der Gehalt an ADF in der reifen Mangosorte Tommy Atkins (Herkunft Mexiko) war im Fruchtfleisch mit 33,3 % am höchsten, der Kern (24,1 %) und die Schale (17,4 %) enthielten deutlich weniger ADF. Bei den Gehalten an NDF verhielt es sich ähnlich, das Fruchtfleisch wies 66,6 % auf, der Kern enthielt 56,7 % und die Schale enthielt vergleichbar geringe Gehalte mit 40,1 %. Die genauen Gehalte sind in Tabelle 1 nachfolgend dargestellt:

Tab. 1: Gehalt der Hauptnährstoffe in verschiedenen Fruchtanteilen der reifen Mangofrucht (in % TM), Sorte Tommy Atkins

Anteil	TS	ADF	NDF	Ra
Schale	21,9	17,4	40,1	0,50
Fruchtfleisch	16,4	33,3	66,6	0,25
Kern	40,8	24,1	56,7	2,13

(Guzmán et al. 2013), Herkunft Mexiko

Neben den Faserstoffen spielen weitere Inhaltsstoffe eine wichtige Rolle bei der Bewertung als Futtermittel. Der Hauptnährstoffgehalt der Schale, des Kerns und des Fruchtfleischs wurde bei verschiedenen Sorten gemessen (Ravindran und Sivakanesan 1996, Ajila et al. 2007). Die Schalen weisen mit 25 - 34 % gegenüber dem Fruchtfleisch mit 19 % einen höheren Gehalt an Trockenmasse auf. Das Fruchtfleisch weist eine feuchte Textur auf, welche es als Rohstoff zur Safftherstellung besonders geeignet macht. Der Rohproteingehalt und der Anteil an stickstofffreien Extraktstoffen (NfE) sind im Kern am höchsten (Rp 6,2 % der TM, NfE 78,6 % der TM), gefolgt von den Mangoschalen (Rp bis zu 2,05 % der TM, NfE bis zu 28,2 % der TM). Die niedrigsten Gehalte an NfE sind im Fruchtfleisch zu finden (16,9 % der TM). Auch ist der Gehalt an Rohfett (0,4 % der TM) und Rohasche (0,4 % der TM) im Fruchtfleisch geringer als in den Anteilen der Schale (Rfe 2,16-2,66 % der TM; Ra 1,16-3,0 % der TM) und des Kerns (Rfe 10,6 % der TM; Ra 2,6 % der TM). Die Daten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Gehalt der Hauptnährstoffe in verschiedenen Fruchtanteilen der reifen Mangofrucht (in % TM)

Sorte	Anteil	TS	Rfa	NfE	Rp	Rfe	Ra
Raspuri, Badami Schale ^{*1}		25-34	3,28-7,40	20,8-28,2	1,76-2,05	2,16-2,66	1,16-3,0
Raspuri, Badami Fruchtfleisch ^{*1}		19	0,7	16,9	0,6	0,4	0,4
Unbekannt	Kern ^{*2}	x	1,9	78,6	6,2	10,6	2,6

TS - Trockensubstanz, Rfa - Rohfaser, NfE - Stickstofffreie Extraktstoffe, Rp - Rohprotein, Rfe - Rohfett, Ra – Rohasche, x-nicht gemessen

¹ (Ajila et al. 2007), Herkunft Indien

² (Ravindran und Sivakanesan 1996), Herkunft unbekannt

Bei der Analyse der Mangoschalen der Sorte Hayden im reifen Zustand waren Kalzium mit 4445 mg/kg TS, Kalium mit 2910 mg/kg TS und Magnesium 950 mg/kg TS festzustellen (Larrauri et al. 1996). Die Mineralstoffgehalte des Fruchtkörpers sind verglichen mit der Schale oder dem Kern insgesamt niedriger. Kalium stellt hier mengenmäßig die größte Fraktion dar mit 1700 mg/kg TS. Im Kern waren 4500 mg/kg TS Kalzium nachweisbar, er wies damit

ähnliche Gehalte wie die Schale mit 4445 mg/kg TS auf. Hohe Magnesiumgehalte waren im Kern mit 9800 mg/kg TS festzustellen, ebenfalls war ein hoher Natriumgehalt mit 1500 mg/kg TS im Vergleich mit dem Fruchtkörper mit 50 mg/kg TS und der Schale mit 638 mg/kg TS zu ermitteln. Im Kern waren 2300 mg/kg TS Phosphor nachweisbar, wohingegen das Fruchtfleisch nur 130 mg/kg TS enthielt, in der Schale wurde der Phosphatgehalt nicht analysiert (Larrauri et al. 1996, Odunsi 2005, Souci et al. 2008).

Die Daten der Mineralstoffgehalte der einzelnen Fruchtanteile sind nachfolgend in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Mineralstoffgehalte in Mangoprodukten in mg/kg TS

	Schale* ¹	Fruchtkörper* ²	Kern* ³
Kalzium	4445	120	4500
Phosphor	x	130	2300
Kalium	2910	1700	600
Magnesium	950	180	9800
Natrium	638	50,0	1500
Eisen	175	4	530
Zink	32.5	1,20	263
Kupfer	<0,03	0,64	402
Mangan	<0,01	1,70	611

*¹ Sorte Hayden, reif, Herkunft Cuba (Larrauri et al. 1996)

*² Sorte unbekannt, reif, Herkunft unbekannt (Souci et al. 2008)

*³ Sorte unbekannt, Herkunft Nigeria (Odunsi 2005)

x = nicht gemessen

2.3. Sekundäre pflanzliche Inhaltsstoffe der Mango

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe weisen interessante Anwendungsgebiete in der Ernährung auf. Als besonders maßgebend werden von vielen Autoren das in der Mango enthaltene Pektin und die Polyphenole angesehen. Bei Pektinen unterscheidet man niedrigveresterte Pektine (Veresterungsgrad < 50 %) von hochveresterten Pektinen (Veresterungsgrad > 50 %). Hochveresterte Pektine weisen stärkere Geliereigenschaften auf als niedrig veresterte. Pektine fallen in hohem Maße bei der industriellen Herstellung von Säften und anderen Produkten an. Die Gehalte an hochveresterten Pektinen in Früchten variieren: Äpfel enthalten 1 – 1,5 %, Aprikosen 1 %, Kirschen 0,4 %, Apfelsinen 0,9–3,5 %, Möhren 1,4 %, Orangenschalen und Zitronenschalen weisen einen hohen Gehalt an Pektinen in Höhe von 30–50 % vor allem im Mesokarp auf. Als reichhaltige Quelle wird auch Apfeltrester mit 15 % Pektinanteil zunehmend verwendet (Peter und Seibel 2015). Der Gehalt an Pektinen in der Mangoschale erreichte bei den unterschiedlichen Sorten

12 – 25 %, der Veresterungsgrad des Pektins variiert zwischen 56 und 66 % (Berardini et al. 2005). Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien überein (Srirangarajan und Shrikhande 1977, Kratchanova et al. 1991). Während der Reife verringert sich der Pektingehalt in den Schalen nicht (Sirisakulwat et al. 2008). Bei der Produktion von Sirup aus reifen Mangos der Sorte Hayden (Anbauland Cuba) wurde der Anteil an Nebenprodukten, insbesondere Schalen und Kerne, mit 35 - 60 % beziffert. Die enthaltenen Pektine haben eine hohe Wasserbindungskapazität, die bei 11 g Wasser/g TS lag (Larrauri et al. 1996).

Mangopektin ist im Fruchtfleisch in geringeren Maßen enthalten. Bei einer Untersuchung von reifem Fruchtfleisch aus Guinea wurden Gehalte in der Sorte Ceni von 5,8 % mit einem Veresterungsgrad von 77,4 % nachgewiesen, wohingegen die Sorte Springfield aus der gleichen Region 9,3 % Pektin mit einem Veresterungsgrad von 62,3 % enthielt (Kratchanova et al. 1991). Der Pektingehalt im Fruchtfleisch nimmt während der Reifungsprozesse aufgrund von enzymatischen Abbauprozessen durch Polygalakturonase, Pektinesterase und β -Galaktosidase in Verbindung mit dem reifungsbedingten fortschreitenden Verlust an Textur kontinuierlich ab (Ketsa et al. 1998). Im Kern wurde der Pektingehalt bisher offenbar nicht untersucht.

Mangopektin wird den hochveresterten Pektinen zugeordnet und weist gute Gelieeigenschaften auf. Vergleichbare Gehalte an Pektinen wurden in Apfeltrester nachgewiesen. Eine Studie verglich die Pektingehalte der Mangoschalen von den Sorten Dassehri, Langra und Alphonso mit den Gehalten in Apfeltrester. Hierbei ergab sich, dass die Mangosorten Dassehri 18 – 19 % TM, Langra 15 – 16 % TM und Alphonso 13 % TM Pektin gegenüber 15 – 18 % TM Pektin in Apfeltrester enthielten (Srirangarajan und Shrikhande 1979). Die gelbildenden Eigenschaften des Mangopektins liegen aufgrund niedrigerer Gehalte an Galakturonsäure unter denen der Apfelpektine und weisen somit verringerte Verdickungseigenschaften auf (Srirangarajan und Shrikhande 1979, Sirisakulwat et al. 2008). Neben den Pektinen der Mangoschalen besteht ein hohes Interesse an den enthaltenen Polyphenolen.

Polyphenole dienen Pflanzen als Schutz gegen Pilz- und Bakterieninfektionen (Matern und Grimmig 1993, Robards et al. 1999). Die Verwendung von Mangoschalen in der Tierernährung wurde aufgrund ihrer Gehalte an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen empfohlen (Ribeiro et al. 2008). Die Polyphenole der Mango wurden chemisch charakterisiert und die Schalen sind eine gut nutzbare Quelle für Polyphenole (Berardini 2005). In einer Untersuchung an 16 verschiedenen Mangosorten aus Brasilien mit unbekanntem Reifegrad wurde der Polyphenolgehalt in Kernen und Schalen bestimmt. Die Gehalte sind im Kern mit bis zu 200 g/kg TM höher als in der Mangoschale mit Gehalten von bis zu 91 g/kg TM (Barreto et al.

2008). Eine Studie verglich die Polyphenolgehalte in den reifen Schalen und im Fruchtfleisch der Tommy Atkins Mango aus Chile. Die Studie konnte zeigen, dass der Polyphenolgehalt in den Schalen mit $43 \pm 3,95$ mg GAE/100 g frischem Material höher lag als im Fruchtfleisch mit $25 \pm 1,72$ mg GAE/100 g frischem Material. Diese Ergebnisse konnten auch für die Gehalte einer weiteren Sorte der gleichen Region bestätigt werden (Ramirez et al. 2013).

Der Gehalt an Polyphenolen wird auch durch die Sorte beeinflusst. In einer Studie wurden 14 verschiedene Mangosorten auf ihren Gehalt an Flavonol O- und Xanthon C-Glukoside, welche jeweils Polyphenolfractionen darstellen, untersucht. Die untersuchten Sorten wiesen große Unterschiede in ihren Gehalten an Flavonolen und Xanthonen auf, sie enthielten zwischen 360 mg/kg (Sorte Mon Duen Gao) und 4860 mg/kg (Sorte José). Eine Identifikation der verwendeten Mangosorten in Qualitätskontrollen wird aufgrund der sortentypischen Muster somit möglich (Schieber et al. 2003b). Der Reifegrad stellt einen weiteren beeinflussenden Faktor für den Polyphenolgehalt dar, da der Gehalt mit der Reifung in den Schalen ansteigt. So konnten bei Schalen von unreifen Früchten der Sorte Raspuri Polyphenole in Höhe von 8,12 mg/100 g TM gemessen werden, bei reifen Schalen derselben Sorte wurde eine vielfache Menge in Höhe von 29,52 mg/100 g TM gemessen. Auch Untersuchungen der Sorte Badami zur selben Zeit bestätigten diese Ergebnisse (Ajila und Prasada Rao 2013). Vergleichbare Studien zu den Veränderungen während des Reifungsprozesses gibt es für Fruchtfleisch und Kerne bisher offenbar nicht.

Die Mango stellt eine reichhaltige Quelle für Polyphenolverbindungen dar, deren Wirkungen noch nicht gänzlich erforscht sind (Gorinstein et al. 1999, Berardini et al. 2004). Mangiferin und die enthaltenen Gallotannine stellen die wichtigsten Komponenten innerhalb der Polyphenolfraction dar (Berardini et al. 2004, Berardini et al. 2005, Masibo und He 2008).

Die in der Mangoschale und Kernen vorkommenden Tannine können einen wichtigen Einfluss auf die Akzeptanz und Verdaulichkeit von Futtermitteln haben. In der Mangoschale wurden 18 verschiedene Gallotanninderivate identifiziert (Kabuki et al. 2000a, Berardini et al. 2004). Sie sind in allen Teilen der Frucht auffindbar, wobei die höchsten Gehalte an Gallotanninen in der Sorte Tommy Atkins in den Kernen mit 15,5 mg/g TM vorlagen, in der Schale waren nur 1,4 mg/g TM nachzuweisen und im Fruchtfleisch 0,2 mg/g TM (Berardini et al. 2004). Unter den Xanthonen wurden Mangiferin, verschiedene Mangiferin-Gallate und α -Mangostin nachgewiesen. Unter den Flavonoiden stellen das Quercetin und das Kaempferol die wichtigsten Komponenten dar, wobei auch zahlreiche Verbindungen dieser Substanzen mit verschiedenen Zuckerresten nachgewiesen worden sind (Berardini et al. 2005). Bei den Gallotanninen handelt es sich wesentlich um Galloylglukose, welche an verschiedenen Stellen Hydroxylierungen aufweisen. Benzophenone, wie das Maclurin werden eingeteilt in verschiedene Major- und Minor-Alkenylresorcinole und waren ebenfalls nachweisbar (Berardini et al. 2004, Knödler et al. 2007). Über die einzelnen Substanzen liegen bisher nur

wenige Daten vor, daher wird im Kapitel 2.6 und 2.7 näher auf die Effekte der Hauptkomponenten wie Tannine und Mangiferin eingegangen. Die Polyphenolfraktion in der Mangoschale ist in Tabelle 4 aufgeführt:

Tab. 4: Polyphenolfractionen von verschiedenen Mangoschalen

Xanthone	Flavonoide	Gallotannine	Benzophenone	Major-Alkenylresorcinole	Minor-Alkenylresorcinole
Mangiferin	Quercetin	Tetra-O-galloyl-Glukose	Maclurin	5-(12-heptadecenyl)-resorcinol	Hydroxyheptadecadienylresorcinol
Mangiferin-Gallate	Quercetin galaktoside	3-O-Penta-O-galloyl-Glukose	Maclurin-mono-O-galloyl-glukoside	5-pentadecyl-resorcinol	Hydroxypentadecenylresorcinol
Isomangiferin	Quercetin glukoside	3-O-Hexa-O-galloyl-glucose	Maclurin-di-O-galloyl-glukoside	5-(9Z,12Z-heptadecenyl)-resorcinol	Tetradecenyl-resorcinol
Isomangiferin-Gallate	Quercetin xyloside	3-O-Hepta-O-galloyl-glucose	Maclurin-tri-O-galloyl-glukoside	5-(12Z-heptadecenyl)-resorcinol	Heptadecatrienyl-resorcinol
α -Mangostin	Quercetin arabinopyranoside	3-O-Octa-O-galloyl-glucose	Iriflophenone di-O-galloylglukoside		Heptadecadienyl-resorcinol
	Quercetin rhamnoside	3-O-Nona-O-galloyl-glucose			Pentadecyl-resorcinol
	Kaempferol				Heptadecenyl-resorcinol
	Kaempferol glukoside	3-O-glukoside			Nonadecenyl-resorcinol

(Berardini et al. 2004, Berardini et al. 2005, Knödler et al. 2007)

2.4. Mangoreste als Futtermittel

Bisher wurden die Schalen der Mango hauptsächlich bei Schafen (Sanon und Kanwe 2010), Rindern (Sruamsiri und Silman 2009), Schweinen (Brucker 2016) und Legehennen als Futtersupplement untersucht (Zia-ur-Rehman et al. 1994). Nur wenige Studien existieren über den Einsatz als Tierfutter bei Broilern und zu den Effekten auf Leistung und Tiergesundheit. Durch die Fütterung von Mangoschalenresten aus der Fruchtsaftindustrie konnte eine Absenkung der Harnstoffausscheidung bei Rindern nachgewiesen werden (Azevêdo et al. 2011). Eine Arbeitsgruppe testete die Wirkung von Mangoresten auf die Leistung bei Broilern. Hierbei wurden gemahlene Mangoschalen inkl. Resten von Mangokernen aus der Fruchtsaftindustrie in einer Dosierung von bis zu 10 % dem Futter der Broiler zugesetzt. Eine Beeinflussung der Futteraufnahme, Körpermassenzunahme oder der Leistungsdaten (Futteraufwand) konnte nicht festgestellt werden, wenn das Produkt mit einem Anteil von bis zu 5 % eingesetzt wurde. Bei höheren Mengen konnte ein ungünstigerer Futteraufwand festgestellt werden. Dieser Effekt wurde auf die möglichen adstringierenden Wirkungen der enthaltenen Tannine im Darm zurückgeführt.

Bei einer Fütterung von mehr als 5 % Mangoresten (Schalen inkl. Kerne) in der Ration wurden eine geringere Gewichtszunahme und eine schlechtere Futtermittelnutzung während des Versuchszeitraums festgestellt. Laut der Meinung der Autoren waren diese Effekte auf die enthaltenen Tannine zurückzuführen, da Tannine durch Komplexbildung fähig sind, eine verminderte Verwertung von Proteinen, Kohlenhydraten und Mineralien herbeizuführen. Bei Anteilen von 2,5 - 10 % Mangoresten in den Rationen der Testgruppen konnte eine linear verminderte Futtermittelnutzung in Kombination mit einer erhöhten Futteraufnahme und einem geringeren Endgewicht ab einem steigenden Gehalt von 5 % bei Mangoresten in der Ration gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Fontes Vieiral et al. 2008).

Einen nachweislichen Einfluss hatte die Fütterung von Mangoschalen auf die Qualität tierischer Erzeugnisse von Broilern in einer weiteren Studie: Nach der Fütterung von 0,02 – 0,04 % eines ethanolischen Mangoschalen- oder Mangokernextraktes im Futter mit einem Polyphenolgehalt des Extraktes von 52 % wurde ein positiver Einfluss auf die Haltbarkeit und Produktqualität des Broilerfleisches nachgewiesen. Die Produkthaltbarkeit und Qualität wurde anhand der Lipidperoxidation und des Farberhalts im gefrorenen Zustand binnen 90 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe ohne Mangoresten in der Ration gemessen. Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde anhand des Gehalts an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) nachgewiesen, wobei bereits ein Gehalt von 0,02 % Mangoschalen oder Mangokernen/kg Futter in der Ration zu einem um 32 - 34 % niedrigeren Gehalt der TBARS gegenüber der Kontrollgruppe führte. Diese Effekte waren konzentrationsabhängig und die

Fütterung von 0,04 % des ethanolischen Extrakts aus Mangokernen/kg Futter stellte sich als die effektivste Variante heraus. Die Absenkung des Gehalts an TBARS erreichte 45 % gegenüber der Kontrollgruppe. Die Fütterung von 0,04 % des Mangoschalenextrakts im Futter führte zu einer ähnlich hohen Absenkung der TBARS gegenüber der Kontrollgruppe. Durch kolorimetrische Messungen wurde geprüft, ob das Fleisch der Versuchsgruppen mit Mangoschalen oder -kernextrakt in der Ration Farbveränderungen gegenüber der Kontrollgruppe langsamer entwickelt. Die Fütterung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Farbverluste während der Lagerung (Freitas et al. 2015).

2.5. Auswirkungen von Mangofütterung auf Hühner

2.5.1. Einfluss der Mangofütterung auf zootecnische Leistungen

Es wurden bisher wenige Studien in Verbindung der Mango und ihrer Beiprodukte, wie Schalen und Kerne, mit Hühnern zu den möglichen Effekten auf die Leistung durchgeführt. Es wurden häufig unterschiedliche Mangokompartimente miteinander verglichen oder gleichzeitig verfüttert, sodass sich kein differenziertes Bild darstellt.

Mangoschalen aus Makurdi (Nigeria) wurden mit dem Fruchtfleisch von den reifen Sorten Julie, Peter, Alphonso, Hindi, John und Lage entfernt, sonnengetrocknet und danach als Mangomehl dem Futter von Broilern in steigenden Konzentrationen von 0, 5, 10, 15 und 20 % zugesetzt. Die Broiler wurden ab dem 28. Lebenstag über 42 Tage mit den Versuchsdiäten gefüttert. Ab einem Gehalt von 15 % an Mangomehl zeigten die Tiere signifikant niedrigere Leistungsparameter. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigten Tiere mit der Fütterung von 5 – 10 % Mangomehl keine Unterschiede. Im Detail zeigte die Kontrollgruppe eine Körpermasse von 2143 g, bei 15 % Mangomehl erreichten die Broiler nur 1880 g, bei 20 % Mangomehl wurden 1783 g erreicht. Die tägliche Futtermittelaufnahme war zwischen allen Gruppen vergleichbar, jedoch wurde der - insgesamt hohe - Futteraufwand der Versuchstiere mit steigendem Gehalt an Mangomehl ungünstiger. Ursachen für die verminderten Leistungsparameter der Versuchsgruppen mit hohen Konzentrationen an Mangomehl wurden in den niedrigeren Gehalten an Rohprotein und in steigenden Gehalten an Polyphenolen und Tanninen bei den Versuchsdiäten gesehen. Auch die Beschaffenheit des Futters war mit steigenden Gehalten an Mangomehl nicht mehr homogen und könnte laut den Autoren zu einer Selektion der Futterpartikel geführt haben (Tyohemba Orayaga et al. 2015). Weitere Studien zur Verwendung von Mangoschalen als Futtermittel bei Broilern oder Legehennen sind offenbar nicht durchgeführt worden.

Mangoschalen wurden hinsichtlich ihres Nutzens in der Ernährung von Broilern und Legehennen auch im Vergleich mit Mangokernen untersucht. Eine Studie an Legehennen wurde im Alter von 28 Lebenswochen für eine Dauer von 17 Wochen mit der Fütterung von Mangoschalen oder -kernen in Höhe von 0 - 8 % durchgeführt. Die Körpermasse im Alter von 45 Wochen wurde maßgeblich durch die Fütterung beeinflusst. Bei Fütterung von 8 % Mangokernen lag diese bei 2,2 kg und damit um 0,5 kg unter denen der Kontrollgruppe. Die Tiere, die die Ration mit 8 % Mangoschalen erhielten, wiesen eine Differenz von 0,1 kg im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die Legeleistung lag nach der Fütterung von 8 % Mangokernen bei 55 Eiern/ 100 Hennen/ Tag, die Kontrollgruppe erreichte demgegenüber 68 Eier/100 Hennen/ Tag, bei Einschluss der Mangoschalen waren vergleichbare Werte festzustellen (69 Eier/100 Hennen/ Tag). Der Futteraufwand je g Eimasse war bei den Tieren mit Mangoschalen in der Ration am geringsten mit 3,15 g, die Kontrollgruppe lag bei 3,55 g und bei Mangokernfütterung stieg der Futteraufwand auf 3,73 g (Zia-ur-Rehman et al. 1994). Verschiedene Inhaltsstoffe der Mangokerne wurden für die verminderte Eiproduktion verantwortlich gemacht. Der hohe Gehalt an Tanninen und Saponinen in den Kernen kann den Geschmack des Futters verändert haben. Hohe Gehalte an Zellulose und Hemizellulose wurden als weitere Ursachen für die Minderung der Futteraufnahme betrachtet. Die Studienergebnisse lassen aus Sicht der Autoren den Rückschluss zu, dass die Fütterung von Mangoschalen bei Legehennen unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht zu Leistungsminderungen führte (Zia-ur-Rehman et al. 1994).

Eine Studie aus Nigeria verglich die Effekte bei der Fütterung einer isokalorischen und isonitrogenen Diät mit steigendem Anteil Mangokernmehl von 0 bis 25 % bei Legehennen und Broilern. Bei Legehennen konnten hier wie bei einer früheren Studie (Zia-ur-Rehman et al. 1994) negative Effekte auf die Futteraufnahme, Eischalendicke, Eianzahl und -masse bei höheren Anteilen an Mangokernmehl nachgewiesen werden. Diese Effekte waren konzentrationsabhängig und ab einem Gehalt von 15 % Mangokernmehl deutlich. Bei Broilern führten Diäten mit bis zu 10 % Mangokernmehl sogar zu einer verbesserten Zunahme. Höhere Mengen (15 und 20 %) Mangokernmehl wiesen keine weiteren negativen Effekte im Vergleich mit der Kontrollgruppe hinsichtlich der Gewichtszunahmen und Futteraufnahme und -verwertung auf, wenn die Ration energetisch sowie hinsichtlich des Proteingehalts durch eine Ergänzung mit Sojamehl ausbalanciert war (Odunsi 2005).

Bei der Fütterung von Mangoresten aus der Saftindustrie an Broiler wurde eine Mischung aus Schalen und Kernen in Konzentrationen von 0 - 10 % über 42 Tage an Broiler gefüttert. Bis zu einem Gehalt an 5 % Mangoprodukten wurde der Futteraufwand nicht ungünstig beeinflusst. Ab einem Gehalt von 7,5 % Mangoprodukten war ein höherer Futteraufwand zu beobachten, was auf den erhöhten Gehalt an Rohfaser, insbesondere Hemizellulose, in den Kernen

zurückgeführt wurde (Fontes Veiral et al. 2008). Diese Unterschiede resultierten nach Meinung der Autoren zusätzlich zum steigenden Fasergehalt aus dem höheren Anteil der enthaltenen Tannine. Kerne von reifen Mangos aus Ägypten wurden unbehandelt an Broiler verfüttert. Der Einfluss der antinutritiven Inhaltsstoffe wurde durch das Kochen oder Autoklavieren der Kerne in weiteren Versuchsgruppen untersucht (Farag und Diaa El-Din 2001). Die Diäten enthielten 20 % der rohen, gekochten oder autoklavierten Mangokerne und wurden ab dem 7. Lebenstag bis zum 28. Lebenstag gefüttert. Die Inaktivierung der antinutritiven Inhaltsstoffe hatte einen signifikanten Einfluss auf die Futteraufnahme, Futteraufwand und Körpermassenzunahme. Die Tiere mit unbehandelten Mangokernen in der Ration zeigten eine niedrigere Futteraufnahme mit einem höheren Futteraufwand und einem niedrigeren Endgewicht gegenüber der Kontrollgruppe. Waren die antinutritiven Inhaltsstoffe durch Kochen inaktiviert, so zeigten die Tiere im Vergleich mit der unbehandelten Mangokernfütterung eine höhere Futteraufnahme, eine bessere Futterverwertung mit einem höheren Endgewicht am Tag 28. Die Ergebnisse der Tiere mit gekochten Mangokernen in der Ration lagen damit zwischen denen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die rohe Mangoschale im Futter erhalten hatte. Hieraus ist zu schließen, dass die unbehandelten Mangokerne die schlechtesten Leistungsdaten erzeugten und das Kochen der Mangokerne am besten dafür geeignet war, die Leistung der Tiere bezogen auf Futteraufwand und Endgewichte durch Inaktivierung der antinutritiven Inhaltsstoffe zu erhöhen. Autoklavieren der Schalen erbrachte keine Verbesserung der zootecnischen Parameter (Farag und Diaa El-Din 2001).

Zusammenfassend lassen sich negative Auswirkungen der Verfütterung von Mangoprodukten auf die Leistung von Hühnern meist bei vergleichsweise hohen Gaben ab 5 - 15 % beobachten (El Alaily et al. 1976, Teguaia 1995, Fontes Veiral et al. 2008). Geringere Gehalte zeigten demgegenüber keine negativen Effekte und sogar höhere Schlachtgewichte (Odunsi 2005).

2.5.2. Einfluss der Mangofütterung auf die Verdauungsphysiologie bei Hühnern

Derzeit liegen nur wenige Studien über die verdauungsphysiologischen Effekte von Mangoprodukten bei Broilern und Legehennen vor. Hierbei wurden insbesondere die Mangokerne genauer betrachtet, wobei im Vergleich mit Mangoschalen viele Inhaltsstoffe in beiden Anteilen der Mangofrucht vorkommen. Bei der Verdauungsphysiologie von Mangobeiprodukten bei Broilern und Legehennen spielen enthaltene Polyphenole, insbesondere Tannine als auch die Rohfasergehalte eine wichtige Rolle. Rohfaseranteile wie Hemizellulose und Zellulose wurden in den Schalen zu 3,3 - 7,4 % und in den Kernen in Höhe von 4,6 % nachgewiesen (Odunsi 2005, Ajila et al. 2007). Durch Zugaben von rohfaserhaltigen Supplementen findet bei Hühnern eine Absenkung der Nährstoffverfügbarkeit statt. Bei der

Erhöhung des Rohfaseranteils um 1 % wird die Verdaulichkeit der Nährstoffe um 2,33 Einheiten verringert. Die Formel für die Berechnung des Einflusses des Rohfasergehalts auf die Verdaulichkeit der Originalsubstanz (voS) lautet: $voS (\%) = 88 - 2,33 * \% Rfa$ (Kamphues et al. 2014).

Ausreichende Mengen an Rohfaser zeigten sich wiederum für die Verdauung bei Hühnern als sehr wichtig, weil sie die Entwicklung der Mikrobiota des Darms fördern konnten sowie die Enterozythen und Motilität günstig beeinflussten. Es wurde festgestellt, dass ein hoher Gehalt an Rohfaser zu einer Veränderung der Organgewichte bei Broilern führte. Eine Erhöhung der unlöslichen Rohfasergehalte durch Supplementierung von rohfaserreichen Komponenten in Höhe von 3 - 10 % resultierte bei Broilern in einer Verkürzung des Dünndarms (Amerah et al. 2009), einem verminderten Vormagengewicht (Jimenez-Moreno et al. 2009) und einem erhöhten Organgewicht des Muskelmagens (Amerah et al. 2009). Diese Veränderungen wurden von den Autoren auf die veränderte Passagezeit und die beeinflusste Peristaltik durch die Fasern zurückgeführt. Diese Veränderungen führten zu einer Verminderung des Karkassengewichts (Jorgensen et al. 1996). Eine Festlegung auf Höchstgehalte ist schwierig, da die faserreichen Futterkomponenten immer weitere Inhaltsstoffe aufweisen, die auf die Verdauung auch positiven Einfluss nehmen. Zu den positiven Einflüssen eines erhöhten Rohfasergehalts wird auch eine Reduzierung des Kannibalismus und des Federpickens gezählt (Bears et al. 1940, Mateos et al. 2012). Nach einer vergleichenden Studie mit unterschiedlichen Gehalten an Rohfaserquellen wie Hüllen von Hafer, Erbsen und Soja als auch pektinreichen Zuckerrübenschnitzeln wurde ein Gehalt von 2 - 3 % Rohfaser bei Broilern empfohlen (Mateos et al. 2012). Die Verwendung von Mangoschalen als auch –kernen sollte daher allein aufgrund der Steigerung der Rohfasergehalte der Ration nur in einem geringen Umfang erfolgen.

Eine weitere wichtige Gruppe an Inhaltsstoffen der Kerne und Schalen der Mango sind die Tannine, da sie die Verdauungseffizienz bei Hühnern konzentrationsabhängig negativ beeinflussen konnten und somit zu den antinutritiven Inhaltsstoffen gezählt werden. Sie setzen grundsätzlich die Verdaulichkeit von Proteinen durch Komplexbildung herab, wobei auch die Quervernetzung von Pektinen und Zellulose neben dem Protein nachgewiesen wurde (Hagerman 1992). Sie haben zusätzlich adstringierende Eigenschaften und erzeugten einen bitteren Geschmack, was sich in einer verminderten Futteraufnahme bei Broilern äußerte (Teguia 1995). Zusätzlich waren Tannine aus Mangokernen in der Lage, das Enzym Trypsin, welches für die Aufspaltung von Protein im Darm bei Broilern zuständig ist, zu inhibieren (Ravindran und Sivakanesan 1996).

Frühere Studien an Broilern mit Mangokernmehl in der Ration bestätigten, dass steigende Konzentrationen die Verdaulichkeit von Proteinen durch die enthaltenen Tannine, Trypsininhibitoren, den Fasergehalt und den cyanogenen Glykoside in den Kernen negativ beeinflussten. Hierbei wurde bei der Erstellung der Diäten Maismehl, das in der Ration der Kontrolltiere mit 100 - 300 g/kg enthalten war, durch Mangokernmehl ersetzt. Allerdings waren die Rationen nicht isonitrogen und isokalorisch erstellt (El Alaily et al. 1976, Tegua 1995).

In einer Studie mit Broilern führte die Fütterung von Mangosamenmehl ab einer Menge von 5 % zu einer schlechteren Futteraufnahme, einer Verringerung der In-vitro-Verdaulichkeit und damit einhergehend einer schlechteren Körpermassenzunahme in-vivo. Ein Teil dieser Effekte wurde auf die Komplexbildung durch die enthaltenen Tannine zurückgeführt, die zu einer geringeren Proteinaufnahme geführt haben. Durch Erhitzen verlieren Tannine einen Großteil ihrer antinutritiven Eigenschaften. So konnte gezeigt werden, dass die In-vitro-Verdaulichkeit von Rohprotein bei unbehandelten Mangokernen bei 26,3 % liegt, während bei gekochten Mangokernen durch die Denaturierung die In-vitro-Verdaulichkeit auf 62,8 % angehoben werden konnte. Die In-vitro-Verfügbarkeit an scheinbar metabolisierbarer Energie liegt in unbehandelten Mangokernen bei 7,88 MJ/kg und bei gekochten Mangokernen bei 10,3 MJ/kg (Ravindran und Sivakanesan 1996). Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie belegt und erweitert werden: Kerne von reifen Mangos unbekannter Sorten aus Ägypten wurden unbehandelt an Broiler in der Ration verfüttert und der Einfluss der antinutritiven Inhaltsstoffe durch das Kochen oder Autoklavieren der Kerne in weiteren Versuchsgruppen untersucht. Rohe Mangokerne enthielten Trypsininhibitoren (29,5 g/kg TS), Tannine (67,4 g/kg) und zyanogene Glukoside (70,6 mg/kg) (Farag und Dīaa El-Dīn 2001), welche einen negativen Einfluss auf die Verdaulichkeit bei Boilern und anderen Tieren haben (Ravindran und Sivakanesan 1995, Puztai 1991). Durch 30 min Kochen wurden 41,7 % der Tannine, 69,4 % der Trypsininhibitoren und 69,3 % der zyanogenen Glukoside entfernt, während die Autoklavierung für 30 min 78,6 % der Trypsininhibitoren, 75,0 % der Tannine und 86,7 % der zyanogenen Glukoside entfernten. Die Proteinverdaulichkeit in-vitro lag bei unbehandelten Mangokernen ähnlich den Ergebnissen von Ravindran und Sivakanesan (1996) bei 28,8 %. Nach 30 min Kochen konnte die Proteinverdaulichkeit auf 64,1 % erhöht werden und den größten Effekt auf die Proteinverdaulichkeit hatte das Autoklavieren für 30 min, was eine Verdaulichkeit von 66,2 % zur Folge hatte. Die Behandlungen hatten auch Einfluss auf den Gehalt scheinbar metabolisierbarer Energie: Unbehandelte Mangokerne hatten einen Energiegehalt von 7,8 MJ/kg, gekochte Schalen 10,4 MJ/kg und 30 min Autoklavierung führten zu einem Energiegehalt von 10,8 MJ/kg (Farag und Dīaa El-Dīn 2001). Die Ergebnisse der beiden Studien zeigten, dass antinutritive Inhaltsstoffe in Mangokernen inaktiviert und die daraus resultierenden Werte für die Nährstoffverfügbarkeit beim Broiler durch thermische Verarbeitungsprozesse positiv beeinflusst werden konnten. Diese Ergebnisse stimmen

überein mit denen einer weiteren Studie zur In-vitro-Verdaulichkeit von Mangokernmehl (Ravindran und Sivakanesan 1996).

Als Nachweis über die Verdaulichkeitseffekte von Polyphenolen konnten folgende Beobachtungen nach der Fütterung von 8 % Mangokernen und Schalen Aufschluss geben: Die Zusammensetzung der Eier von Legehennen im Zeitraum der 28. – 45. Lebenswoche wurde durch die Fütterung der Mangokerne oder Schalen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant beeinflusst. Der Wassergehalt von Eiern war bei der Versuchsgruppe mit Mangokernen mit 758 g/kg Eimasse am höchsten, wohingegen die Mangoschalenfütterung zu einem Gehalt von 738 g Wasser/kg Eimasse führte und somit minimal höhere Ergebnisse erzeugte wie die Kontrollgruppe mit 736 g Wasser/kg Eimasse. Ähnliche Verteilungen spiegeln sich in den Gehalten an Proteinen, Lipiden und Mineralien wieder. Der Proteingehalt war mit 117 g/kg Eimasse bei den Tieren mit der Mangokernfütterung am geringsten im Vergleich mit der Kontrollgruppe (128 g/kg Eimasse) und bei Fütterung von Mangoschalen (126 g/kg Eimasse). So wiesen die Eier der Tiere mit der Mangokernfütterung nur ein Viertel (2 g/kg Eimasse) der Mineralstoffmengen im Ei gegenüber der Kontrollgruppe (8 g/kg Eimasse) auf. Die enthaltenen antinutritiven Inhaltsstoffe der Mangokerne wurden als Ursache von den Autoren vermutet. Auch konnte eine grünlich - gelbliche Verfärbung des Eidotters nachgewiesen werden, was auf eine Absorption und Reposition der enthaltenen Polyphenole der Mangokerne zurückgeführt wurde. Besonderheiten bei der Farbe des Eidotters oder der Futteraufnahme wurden in einer Studie im Zusammenhang mit der Mangoschalenfütterung nicht erwähnt (Zia-ur-Rehman et al. 1994).

Weitere Ergebnisse zur Verdaulichkeit von Mangoschalen oder dem Fruchtfleisch bei Broilern oder Legehennen sind bisher offenbar nicht veröffentlicht worden.

2.6. Besonderheiten von Pektinen in der Geflügelfütterung

Hochmethyliertes Pektin, wie es auch in der Mango nachgewiesen worden ist, hat eine sehr hohe Wasserbindungskapazität. In einer Studie an Broilern mit 3 % hochmethyliertem Zitruspektin war die Wasseraufnahme der Tiere signifikant höher als bei der Kontrollgruppe ohne Pektinfütterung. Der Kot wies eine gelartige Textur auf, was einen negativen Einfluss auf die Beschaffenheit der Einstreu hatte. Pektine dienen als Energiequelle für verschiedene Mikroorganismen. Bei Broilern zeigte sich ein Anstieg einiger fakultativer bzw. anaerober Bakteriengruppen (Enterococcen, *Bacteroidaceae*, Clostridien und *E. coli*) bei der Fütterung mit hochmethyliertem Pektin. Weiterhin war eine Veränderung der Darmwandmorphologie mit einer um 66 % erhöhten Anzahl an Becherzellen, einer Zunahme zungenförmiger Zotten und der Reduktion anderer Zottenformen zu beobachten. Es wurde eine Aktivitätssteigerung des

membranständigen Enzyms Saccharase - Isomaltase nachgewiesen. Diese Modifizierungen gingen einher mit einer Absenkung der Verdaulichkeit der Trockensubstanz, des Rohfettes, des Rohproteins und - trotz erhöhter Enzymaktivität - einer verringerten Verdaulichkeit der Stärke. Der Gehalt an umsetzbarer Energie in der Diät mit hochmethyliertem Pektin war im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant niedriger. Diese führte zu einer um 19 % geringeren Körpermassenzunahme und zu einer um 37 % schlechteren Futtermittelverwertung der Broiler (Langhout et al. 1999). In einer weiteren Studie mit 1,5 und 3 % hochmethyliertem Pektin war dosisabhängig eine reduzierte Futtermittelverdaulichkeit festzustellen. Die zäkalen Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren (Propionsäure, Valeriansäure und Buttersäure) waren deutlich reduziert. Zusätzlich war eine Verringerung der Organengewichte von Leber und Dünndarm festzustellen, wohingegen die Blinddärme ein höheres Gewicht im Vergleich mit den Werten der Kontrollgruppe aufwiesen (Langhout und Schutte 1996). Die Auswirkungen von 10 - 40 g Apfelpektin zusätzlich zur Ration wurde bereits an Broiler-Elterntieren mithilfe einer Kolostomie getestet und es zeigte sich, dass der Trockensubstanzgehalt der Digesta im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert wurde. Die Stickstoffausscheidung im Kot wurde ab einer Menge von 20 g Apfelpektin signifikant erhöht. Die Pektinsupplementierung von 40 g Apfelpektin / Tier führte zu einer Erhöhung von Acetat, Propionat und Butyrat im Koloninhalt (Zander et al. 1988).

Studien mit dem Fokus auf die Auswirkungen von einer geringen Dosis Mangopektin in Kombination mit den anderen Inhaltsstoffen der Mango gibt es bisher offenbar nicht.

2.7. Effekte von Polyphenolen und anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen bei Hühnern

Mango-Polyphenole wurden bisher als Komponenten der Beiprodukte wie Schalen und Kernen an Hühnern und verschiedenen pathogenen Bakterienkulturen getestet. Gerade die antibakteriellen Eigenschaften der Mangopolyphenole wurden näher untersucht, um neue Verwendungsmöglichkeiten in der Tierhaltung zu finden. Mit einem Mangokernextrakt, welcher zu 79 % aus Polyphenolen bestand, wurden antimikrobielle Eigenschaften gegenüber gramnegativen enteropathogenen Bakterien wie z. B. *Escherichia coli*, Salmonellen und grampositiven Bakterien wie Clostridien und einem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* in-vitro bestätigt.

Hierbei war die inhibierende Wirkung des Extraktes bei grampositiven Staphylokokken und Clostridien bereits ab einer Konzentration von 0,005 % gegeben, alle 41 Bakterienstämme der 18 grampositiven oder -negativen Spezies wurden bei einer Konzentration von 0,25 % des

Extrakts inhibiert. Der Effekt wurde auf die Polyphenole zurückgeführt. Laktobazillen konnten nicht durch den ethanolischen Extrakt inhibiert werden (Kabuki et al. 2000a). Unter den in der Mango enthaltenen Polyphenolen ist vor allem das Mangiferin als antimikrobiell wirksame Substanz neben den enthaltenen Tanninen relevant. Mangiferin wurde mit einem Gehalt zwischen 300 – 1300 mg/kg in der Mangoschale nachgewiesen (Berardini et al. 2005). Unter den zahlreichen Studien über verschiedene Wirkungen des Mangiferin spielten antimikrobielle Wirkungen eine herausragende Rolle, jedoch wurden diese offenbar bisher nicht in Studien an Hühnern untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch Mangiferin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und auch Schimmelpilze wie *Candida albicans* und *Aspergillus niger* gehemmt wurden (Singh et al. 2009).

Weiterhin zeigten sich auch immunmodulatorische Effekte von Mangiferin durch den Schutz von Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vor oxidativem Stress. Bei Ratten wurde der Einfluss auf eine durch Cyclophosphamid induzierte Immunotoxizität durch die intraperitoneale Injektion von Mangiferin untersucht im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Mangiferinapplikation. Es zeigten sich verminderte Entzündungsprozesse nach täglicher intraperitonealer Injektion von bis zu 20 mg Mangiferin/kg Körpermasse bei verbesserter Gesundheit im Vergleich zur Kontrollgruppe (Muruganandan et al. 2005b). Die Wirkungen von Mangiferin basierten vermutlich auf seiner Funktion als Radikalfänger im Stoffwechsel der Zellen (Martínez et al. 2000).

Diese antioxidativen Effekte konnten auch nachgewiesen werden, wenn Mangiferin als Mangokern- und Mangoschalenextrakt an Broiler gefüttert wurde. Dieses wurde auch als Nachweis für die Absorption der Polyphenole der Mango bei Hühnern bewertet. Hierbei sind naturgemäß auch andere Polyphenole enthalten, wobei Mangiferin neben den Tanninen die Hauptkomponente darstellte.

Durch den Zusatz der Mangoschalen- oder Mangokernextrakte ab einer Konzentration von 0,02 % im Futter wurde die Haltbarkeit des Schlachtkörpers über 90 Tage im tiefgefrorenen Zustand verbessert. Dabei zeigte sich, dass Mangokernextrakt in einer Konzentration von 0,04 % im Futter die höchste Reduktion der Lipidperoxidation bewirkte. Bei einer Konzentration von 0,02 % Extrakt im Futter waren Mangoschalen ebenso effektiv wie Mangokerne (Freitas et al. 2015).

Gallotannine stellen eine weitere große Fraktion innerhalb der Polyphenole dar (Berardini et al. 2004), weshalb ihre Auswirkungen auf die Leistung von Hühnern und Broilern Gegenstand einiger Studien waren. Gallotannine reduzierten in-vitro die Verdaulichkeit des in der Futtermischung enthaltenen Proteins aufgrund der Bildung enzymunlöslicher Komplexe (Hagerman 1992). Tannine sind in der Lage, Proteine zu vernetzen und inhibieren zusätzlich Trypsin, welches für die Proteinverdauung essenziell ist. Über diese Mechanismen mindern sie die Verdaulichkeit der Proteinfraction (Ravindran und Sivakanesan 1996). In einer Studie

an Broilern konnte gezeigt werden, dass ein Gehalt von bis zu 10 % Mangoresten (Schalen und Kerne) mit den darin enthaltenen Tanninen keinen negativen Einfluss auf die Futteraufnahme und Leistung hatte (Fontes Vieiral et al. 2008). Einflüsse der Tannine können durch Erhitzen reduziert werden. So konnten bis zu 20 % Mangokerne im Futter an Broiler enthalten sein, ohne negative Einflüsse auf die Leistung und das Verhalten der Tiere zu erzeugen (Joseph und Abolaji 1997). In einer weiteren Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch Erhitzung der Tannine aus der Mango die negativen Auswirkungen auf die Proteinverdaulichkeit bei Broilern um 75 % verringert werden konnten. Hier wurde jedoch ein negativer Einfluss auf die Leistung bis zum 28. Lebenstag zeitweilig festgestellt. Die Futteraufnahme, Körpermassenzunahme und der Futteraufwand der Versuchsgruppen mit Mangokernen im Futter lagen im Vergleich zur Kontrollgruppe in ungünstigeren Bereichen. Dieser negative Effekt hatte sich allerdings zu mindestens in der Körpermassenentwicklung bis zum Versuchsende (63 d) wieder ausgeglichen (Diarra und Usman 2008).

Bei einem Fütterungsversuch an Hühnern mit Polyphenolen aus grünem Tee, die teilweise mit denen der Mango identisch sind, wurde festgestellt, dass diese bei einer Fütterung von 2 g Polyphenolen/kg Futter signifikante Einflüsse auf die Bakterienpopulationen im Zäkum hatten. Die Polyphenole führten zu einer Absenkung der Gesamtanzahl von Bakterien, wobei die Populationen an Staphylokokken, Pseudomonaden und Hefen anstiegen. Bei einer langfristigen Fütterung (> 30 d) konnte eine Erhöhung der Laktobazillen und Hefen festgestellt werden. Durch die Fütterung der Polyphenole sank der Gehalt an Ammonium, Phenol und Skatol im Zäkuminhalt gegenüber den Werten der Kontrollgruppe signifikant, was mit der Reduktion der Populationen an *Bacteroidaceae* und *Proteus* spp. begründet wurde. Die für die Gesundheit des Wirts als positiv erachteten Laktobazillen zeigten eine starke Erhöhung, während die Konzentrationen an Enterobakterien und *Proteus* spp. sanken. Auch spiegelte sich diese Beeinflussung der Mikrobiota durch die Polyphenole in den gesteigerten Gehalten an den flüchtigen kurzkettigen Fettsäuren Essigsäure und Buttersäure im Zäkum wieder, was mit einer Steigerung der Populationen an Laktobazillen in Verbindung gebracht wurde (Terada et al. 1993).

Ein weiterer Effekt, der für die Tierhaltung interessant sein könnte, zeichnete sich auf das Immunsystem ab. Verschiedene Gallotannine aus Euphorbia-Arten, die ebenfalls denen der Mangoschale sehr ähnlich sind, konnten die Immunantwort von Hühnern beeinflussen. Eine Stimulation mit Lipopolysacchariden führte unter anderem zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Makrophagen und verursachte dadurch neben weiteren Mediatorsubstanzen eine Entzündung. Durch Gallotannine konnte in-vitro eine Hemmung der Produktion von Stickstoffmonoxid als proinflammatorischem Transmitter in Makrophagen

nachgewiesen werden, wodurch eine Hemmung der entzündlichen Reaktion bei einer Infektion mit gramnegativen Bakterien festgestellt wurde (Kim et al. 2009).

2.8. Schlussfolgerung aus der Literaturübersicht

Das Mangopektin kann offenbar bereits in kleinen Mengen zu höheren Feuchtigkeitsgehalten der Exkremate und Leistungsminderungen führen. Ob eine niedrige Dosierung der Mangopektine in Kombination mit denen in der Mango enthaltenen Polyphenolen zu positiveren Effekten auf die Leistung führen oder ob durch den Entzug des Pektins andere Auswirkungen bei Broilern beobachtbar wären, soll in der vorliegenden Studie untersucht werden. Hierbei sollten zunächst zwei In-vitro-Versuche für eine erste Bewertung der Mangoschale und einzelner Komponenten im Vergleich mit Apfelpektinen durchgeführt werden. Die möglichen adhäsiven Eigenschaften der Pektine auf ausgewählte *E. coli* sollten untersucht werden im Vergleich mit den vielversprechenden Polyphenolen mit ihren laut Literatur antibakteriellen Eigenschaften, wie auch die Einflüsse auf die Produktion von Metaboliten in einem Kurzzeitinkubationsmodell mit der Flora aus Zäkuminhalt von Broilern, um erste Effekte in-vivo einschätzen zu können. Aus den Ergebnissen in-vitro sollen die vielversprechendsten Komponenten nachfolgend in-vivo untersucht werden, um die weltweit anfallenden Tonnen an Mangoschalen mit ihren wertvollen Inhaltsstoffen einer sinnvollen Verwertung mit Mehrgewinn für die Gesundheit und Mastleistung von Broilern zuzuführen.

2.9. Ziel der Arbeit

Bisher existiert nur eine sehr lückenhafte Studie über den Effekt der Mangoschalenfütterung bei Broilern. Hierbei wurde bisher nur ein Gemisch aus Schalen und Fruchtfleisch mit Kernanteilen verfüttert, welche nicht dem Nährstoffprofil reiner Mangoschalen entsprachen. Die Gehalte waren hier höher angesiedelt und führten zu einer Leistungsdepression ab einem Gehalt von über 5 %. Niedrigere Gehalte (2,5 und 0 %) hatten keinen Einfluss auf die Mastleistung. Nähere Untersuchungen auf Effekte in-vitro wurden nicht mit Proben von Broilern durchgeführt, durch Versuche mit anderen Tierarten wurde aber eine Modifikation der bakteriellen Flora mit Einfluss auf die Metaboliten festgestellt. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, inwiefern Mangoschalen ohne und mit Pektin im Vergleich mit Apfelpektin und Mangopolyphenolen einen Einfluss auf die Zäkumbakterien und deren quantitativen Populationsgrößen (in-vitro) haben können. Der Einfluss auf verschiedene aviäre enteropathogene *E. coli* sollte mittels einer In-vitro-Methode näher untersucht werden, um daraus erste Hinweise auf antibakterielle Effekte gegenüber stalltypischer und pathogener

Stämme in-vivo ziehen zu können und die Theorie zu überprüfen, ob eine Adhäsion an die Substanzen der Mango zu einer schnelleren Ausscheidung in-vivo mit Verringerung des Infektionsrisikos führen könnte. Von besonderem Interesse ist die Einschätzung der Effekte von hochmethyliertem Mangopektin auf die Leistung von Broilern während der gesamten Mastperiode (35 d) und damit der Vergleich von pektinhaltigen bzw. depektinisierten, polyphenolreichen Mangoschalen in der Fütterung von Broilern, wenn diese nur in geringen Konzentrationen zugeführt werden. Hierbei sollte insbesondere der Einfluss auf die Metaboliten, die bakterielle Zusammensetzung der Flora und die Verdaulichkeiten verschiedener Aminosäuren und Protein evaluiert werden.

3. Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit ist in zwei In-vitro-Versuche und einen Tierversuch unterteilt:

Charakterisierung einer präbiotischen Wirkung mittels semi-kontinuierlichen Fermentationssysteme

Charakterisierung von Adhäsionseffekten pflanzlicher Extrakte auf ausgewählte aviäre *Escherichia coli*

Fütterungsversuche – Testung der Mangoschale als Futterzusatz bei Broilern

In-vitro-Untersuchungen

3.1.1. Charakterisierung einer präbiotischen Wirkung mittels semi-kontinuierlichen Fermentationssysteme

Zur Untersuchung möglicher präbiotischer Einflüsse der Testsubstanzen aus der Mango wurde die modifizierte Hungate-Technik (Hungate 1950) als semi-kontinuierliches, anaerobes Kurzzeit-Inkubationssystem genutzt. Hierbei wurden Einflüsse der fünf Testsubstanzen auf den Stoffwechsel der Bakterienpopulation aus Zäkuminhalt von Broilern als Inokulum untersucht.

Herkunft und Wahl der Substanzen

In den Vergleich wurden fünf Substanzen einbezogen: Apfelpektin (AP), Mangopektin (MP), Glukose (G), Mangopolyphenole (P) und Mangoschale (MS).

Das verwendete Apfelpektin wurde von dem Projektpartner Herbstreith & Fox KG bereitgestellt (Classic AU, Herbstreith & Fox GmbH, Werder an der Havel, Deutschland). Das Mangopektin (aus Mangoschalen der Sorte Kaew, Thailand), die Mango-Polyphenolefraktion (Sorte Kaew, Thailand) sowie die Mangoschale (Sorte Kaew, Thailand) wurden von der Universität Hohenheim (AG Carle, Geerkens) zur Verfügung gestellt. Als Positivkontrolle wurde Glukose (D - (+) - Glukose, Sigma - Aldrich Co., St. Louis, USA) verwendet.

Bei Vorversuchen hat sich der Gehalt an Pektinen in der Substanzlösung mit 2 % als limitierender Faktor gezeigt, da eine höhere Menge nicht zu einer homogenen Verteilung führte und die Filtrierung mittels Spritzenvorsatzfilter nicht durchgeführt werden konnte.

Herkunft und Wahl des Inokulums

Um die Zäkumsuspension als Inokulum für die Hungate-Röhrchen herzustellen, wurde von drei Broilern der Zäkuminhalt als Poolprobe entnommen. Zuvor sind die Tiere 35 Tage ohne Zusatz aus Mango gefüttert worden. Es handelte sich hierbei um die Kontrollgruppe eines anderen Versuchs im Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin. Dieses Verfahren wurde an drei unterschiedlichen Tagen wiederholt. Insgesamt 1 g Zäkuminhalt wurde aus der durchmischten Poolprobe entnommen und in PRAS - Puffer („Prereduced Anaerobe Sterilized“ Medium, siehe Anhang unter A.1.1.) in einer Verdünnung von 1:10 gegeben und homogen vermischt.

Versuchsdurchführung

Insgesamt 36 Hungate-Röhrchen wurden mit 8 ml PRAS – Puffer für die spätere Inkubation befüllt. Die Röhrchen wurden mit einem Gummistopfen und Gewinde luftdicht verschlossen und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert (Laboklav, SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland). Dabei wechselte die Farbe des Puffers von Bläulich - lila zu farblos mit rosafarbenem Ring an der Oberfläche. Zusätzlich wurden mehrere 100-ml-Gefäße (Afnor Anaerobier-Gefäße, Greiner Glasinstrumente GmbH, Lemgo, Deutschland) mit PRAS-Puffer für die Verdünnung der Substanzen und des Inokulums befüllt und autoklaviert. Die herzustellenden Substanzlösungen wurden in einem sterilen 50-ml-Gefäß (Greiner Röhrchen 50 ml, CELLSTAR®PP Test Tubes, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) angesetzt. Dazu wurden 0,3 g Substanz zu 15 ml PRAS-Puffer gegeben und somit eine sterile 2 %ige Substanzlösung pro Testsubstanz als Stammlösung hergestellt. Um die Substanzen besser zu lösen, wurden jeweils 15 sterile Glasperlen in die Gefäße gegeben. Diese Gemische wurden im Anschluss auf einem Schüttler (Reax 2000, Heidolph-Instruments GmbH & Co., Schwabach, Deutschland) für 4 x 15 min homogenisiert. Nach jeweils 15 min auf dem Schüttler folgte eine zehnmütige Behandlung in einem Ultraschallbad (Sonorex Typ RK 106, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland). Bei den Pektinen war es zusätzlich notwendig, die nach den 15 min im Schüttler gebildeten Substanzkonkremente vom Rand des Gefäßes mittels eines sterilen Spatels zu lösen und wieder in die Lösung zu überführen. Die Röhrchen wurden dann weitere 15 min im Ultraschallbad behandelt und im Anschluss wie alle Substanzlösungen steril filtriert. Dazu wurde die gesamte Substanzlösung mit einer Spritze (20-ml-Spritze Terumon syringe steril, BSN medical GmbH, Hannover, Deutschland) aufgezogen und durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) in ein neues steriles 50-ml-Gefäß filtriert. Im Anschluss wurde die Prozedur mit einem kleineren Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm Spritzenvorsatzfilter, VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland) wiederholt.

Pro Durchgang wurden 36 Hungate-Röhrchen mit jeweils 8 ml PRAS-Puffer versetzt, verschlossen und autoklaviert. In diese Gefäße wurde jeweils 1 ml der Substanzlösungen in dreifachem Ansatz gegeben und je 1 ml der 10 %igen Zäkumdigestalösung hinzugefügt. Vor dem Pipettieren wurden die Substanzlösungen und Digestalösungen sorgfältig homogenisiert. Kontrollproben wurden im dreifachen Ansatz für den Puffer, die Substanzlösungen und die Zäkumsuspension angesetzt. Alle Ansätze wurden über 24h bei 38°C im Schüttelinkubator (Modell 3033 GFL®, GFL mbH, Burgwedel, Deutschland) bei 110 Umdrehungen/min inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation folgten die pH-Messung und das Abfüllen von je 2 ml in Eppendorfgefäße (Eppendorf Gefäße 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zur späteren Analyse von Ammonium und flüchtigen Fettsäuren.

Messung der pH-Werte

Um mögliche Effekte der Testsubstanzen auf die Bakterien im Inokulum zu untersuchen, wurde unmittelbar nach Ablauf der Inkubation eine Messung der pH-Werte vorgenommen.

Das pH-Meter (InLab®410 pH-Kombinationselektrode, Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) wurde auf ATC (Automatische Temperatur-Kontrolle) eingestellt, um mögliche Einflüsse durch die Temperatur auf den pH-Wert auszuschließen. Zuvor wurde das pH-Meter mit Standardlösungen (pH-Pufferlösung pH 4 und pH 7, Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) kalibriert.

Messung von Ammonium

Für die Messung des Ammoniumgehalts wurde die Berthelot-Reaktion genutzt. Die Reaktion von Ammonium erfolgte mit Hypochloramin zu Monochloramin. Das Monochloramin reagierte mit Thymol zu N-Chlor-2-isopropyl-5-methylchinon-monoimin und mit einem weiteren Molekül Thymol zum blaugefärbten Indophenol. Diese Farbveränderung und die Intensität wurden photometrisch bestimmt. Die Herstellung der benötigten Lösungen ist nachfolgend im Anhang unter A.1.2. aufgeführt. Zur Messung diente eine Mikrotiterplatte (ELISA plate Microlon F-shape, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland), in deren Vertiefungen je 20 µl Standard bzw. unverdünnte Probe pipettiert wurden. Es folgte die Zugabe von je 100 µl Reagenzlösung I und II/Vertiefung. Die photometrische Messung erfolgte jeweils als Doppelbestimmung bei 620 nm (Photometer TECAN sunrise, Tecan Group Ltd., Crailsheim, Deutschland) mit der dazugehörigen Software (XFluor 4, Tecan Group Ltd., Crailsheim, Deutschland).

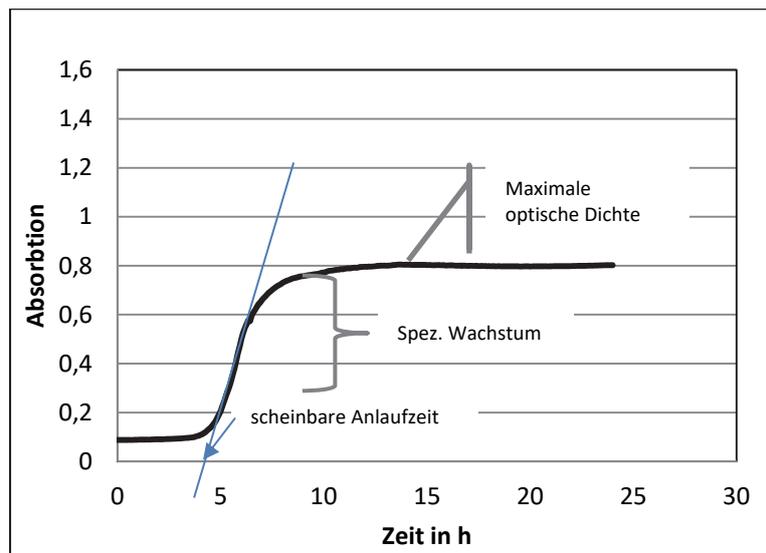
Messung der kurzkettigen Fettsäuren

Nach dem Auftauvorgang der Proben für 15 min auf Eis wurden alle zunächst 1 min durchmischt (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA). Es wurden jeweils 500 µl Probe mit derselben Menge ISTD (0,5 mmol/l) in Eppendorfggefäße (Eppendorf Gefäße 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gefüllt und in einem Rüttler (Reax 2000, Heidolph-Instruments GmbH & Co., Schwabach, Deutschland) 1 h gemischt. Die Eppendorfggefäße wurden für 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss hieran wurden 800 µl (Eppendorf Pipette Typ Research 100-1000 µl; Pipettenspitzen 1000 µl; ep T.I.P.S. Standard Bulk, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) der flüssigen Probe direkt in die Messgefäße (Screw cap vials, Agilent Technologies Inc., Kalifornien, USA) gefüllt, diese wurden mit dem dazugehörigen Septum verschlossen, erneut durchmischt und gemessen. Für die Messung wurde ein Gaschromatograph (Agilent Technologies 6890N mit Autosampler G2614A und Injektionsturm G2613A, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland) genutzt. Die Herstellung der vom Gerät benötigten Lösungen ist im Anhang unter A.1.3. dargestellt. Hierbei wurde die Probe chromatographisch mit der HP-INNOWAX Säule (19095N-123 HP-INNOWAX, Polyethylen Glycol, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) unter Verwendung des Trägergases Wasserstoff gemessen. Der Gehalt an flüchtigen Fettsäuren wurde im Anschluss an die Messung mittels der manuellen Flächenintegration der angezeigten Peaks bestimmt und anhand der Standards mit der dazugehörigen Programm HP ChemStation Software (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) interpretiert.

3.1.2. Charakterisierung von Adhäsionseffekten pflanzlicher Extrakte auf ausgewählte aviäre *E. coli*

Bei diesem Versuch sollten die unterschiedlichen Adhäsionseffekte der Testsubstanzen gegenüber verschiedener aviär pathogener und apathogener *E. coli* untersucht werden. Das Modell beruhte auf dem modifizierten Verfahren von (Becker et al. 2007), bei dem eine hierfür speziell geeignete Mikrotiterplatte (ELISA plate MICROLON, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) genutzt wurde. Die Struktur der Oberfläche in den Vertiefungen war durch eine hohe Bindungskapazität gegenüber pflanzlichen Substanzen gekennzeichnet. Die Oberflächenbeschaffenheit auf Mikroebene ahmte die polymorphe Glykokalix-Struktur der Darmwand nach und der Versuchsablauf war im Institut für Tierernährung bereits etabliert (Gaertner 2011). Diese Mikrotiterplatte wurde mit denselben Substanzen wie im vorangegangenen Versuch beschichtet und im weiteren Verlauf mit den aviären *E. coli* - Stämmen (siehe Anhang unter A.2.1.) in Kontakt gebracht. Nicht gebundene Bakterien wurden durch mehrere Waschungen entfernt. Im Anschluss wurde das Bakterienwachstum mittels eines Plattenlesers bei 620 nm für 24h ermittelt. Das Bakterienwachstum wurde hierbei indirekt über die Erhöhung der optischen Dichte erfasst. Das Versuchsmodell folgte dem Prinzip, dass

eine Zunahme der optischen Dichte ein Maß für das Wachstum der Bakterien und einer damit verbundenen vorherigen Adhäsion darstellt. Eine Wachstumskurve auf Basis der gemessenen Extinktionswerte bei der Inkubation wurde berechnet. Da das Wachstum der Bakterien zeitlich einem sigmoidalen Verlauf folgte, war es möglich die Phasen der scheinbaren Anlaufzeit, das spezifische Wachstum der Bakterien im Vergleich zueinander und der maximalen optischen Dichte (Abbildung 3) zu berechnen.



Scheinbare Anlaufzeit: Schnittpunkt einer Hilfstangente mit der x-Achse, der die Zeit bis zur Wahrnehmbarkeitsschwelle kennzeichnet, addiert mit einem Extra, das von der Steigung der Tangente abhängt (Pirt 1975).

Abb. 3: Beispiel einer Wachstumskurve für Mangopektin mit *E. coli* IMT 15146

Durch die Ergebnisse konnte abgeleitet werden, ob die Testsubstanzen eine geeignete Oberfläche für die Adhäsion von *E. coli* besitzen. Bei diesem Versuch konnte auch gezeigt werden, ob die Testsubstanzen möglicherweise direkt antibakterielle Fähigkeiten besitzen oder durch Bindung an ihre Oberflächenstrukturen pathogene *E. coli* von der Adhäsion an die Kohlehydratrezeptoren der Darmwand und einer damit einhergehenden Infektion abhalten können. Die Herstellung aller Arbeitslösungen ist im Anhang (unter A.2.2.) aufgeführt.

Herkunft der Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienkulturen wurden vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin bereitgestellt. Die Stämme mit den dazugehörigen Eigenschaften sind im Anhang unter A.2.1. dargestellt.

Anzucht und weitere Vorbereitungen des Inokulums

Für die Anzucht und Vorbereitung der eingesetzten Bakterienstämme wurden Kryokulturen (38 °C) verwendet. Eine Kryoperle mit daran adhärenen *E. coli* wurde in ein 50-ml-Zentrifugengefäß (Greiner Röhrchen 50 ml, CELLSTAR®PP Test Tubes, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegeben, in dem jeweils 10 ml klares BHI-Medium enthalten war. Die Anzuchtgefäße wurden in den Schüttelinkubator (Schüttelinkubator Modell 3033 GFL®, GFL mbH, Burgwedel, Deutschland) gestellt und mit 110 Schüttelbewegungen pro Minute bei 38 °C inkubiert. Insgesamt wurden alle Bakteriensuspensionen mindestens achtmal passagiert, um einen optimalen Vermehrungszyklus herbeizuführen. Dabei wurden jeweils 100 µl im Abstand von 12 Stunden in ein neues Gefäß mit 9,9 ml BHI-Medium überführt und wieder in den Schüttelinkubator gestellt. Hiernach wurden die Gefäße mit der *E. coli* - Pufferlösung für 10 Minuten bei 4 °C und 289 x g zentrifugiert, dekantiert und im Anschluss wurde das entstandene Pellet in 5 ml PBS-Puffer gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden in einer Thoma-Zählkammer (Thoma Zählkammer 0,02, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit 40-facher Vergrößerung in je 16 Kammern von 5 Quadraten ausgezählt. Mittels Umrechnungstabelle wurde der Gehalt an *E. coli* mit der nachfolgenden Formel ermittelt:

Zellzahl pro ml: $(1000 \times \Sigma \text{Zellzahl } 80 \text{ Kleinquadrate}) / (80 \times 0,0025 \times 0,02)$

1000 = Faktor für den Gehalt in 1000 µl

80 = Anzahl der ausgezählten Kleinquadrate

0,0025 = Fläche eines Kleinquadrates in cm²

0,02 = Schichtdicke der Zählkammer

Im Anschluss an die Ermittlung der Bakterienanzahl pro ml wurden die *E. coli* -Lösungen auf einheitliche 10⁸ Zellen/ml mit PBS eingestellt. Als Wasch- und Suspensionsmittel wurde PBS verwendet.

Durchführung des Adhäsionsversuchs

Der Überstand der Substanzlösungen wurde nach dem Zentrifugieren für die Beschichtung einer 96-Well-Platte mit einer Einfachpipette (Eppendorf Pipette Typ Research 100-1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 350 µl/Vertiefung verwendet und für 12 h bei 4 °C mit einem Deckel über Nacht bei 20 °C in der sterilen Arbeitsbank (Laminar Air Flow, Faster GmbH, Mailand, Italien) inkubiert. Nach Ablauf der 12 h wurde die Mikrotiterplatte mit einer 8 - Kanal - Pipette (Eppendorf Multipipette® plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

vorsichtig geleert, ohne die Böden der Vertiefungen zu berühren. Die Kavitäten der Platte wurden mit jeweils 350 µl PBS mit der 8 - Kanal - Pipette gewaschen. Die Adhäsionsreaktionen der Substanzen an die Mikrotiterplatte wurden dann mit einer Stopplösung (siehe Anhang unter A.2.2.) mit 350 µl/Vertiefung unterbrochen und bei 4 °C für 60 min mit dieser Stopplösung inkubiert. Im Anschluss an die Stoppreaktion wurde die gesamte Platte mit 300 µl PBS - Puffer/Vertiefung zweimal gewaschen. Vor Hinzugaben der Bakteriensuspensionen (Herstellung siehe Anhang unter A.2.2.) nach 12 h wurden diese auf 10⁸ Zellen/ml unter Verwendung der Thoma-Zählkammer (wie in Kapitel 3.1.2. unter „Anzucht und weitere Vorbereitungen des Inokulum“ beschrieben) eingestellt. Im Anschluss daran wurden die *E. coli* -Kulturen auf die Platte mit 300 µl/Vertiefung aufgebracht. Die mit Bakterien beschichtete Platte wurde für 30 min bei 20 °C inkubiert, um eine Adhäsion der *E. coli* an die Substanzen auf der Beschichtung zu ermöglichen. Danach wurden die einzelnen Vertiefungen vorsichtig geleert und 3 x mit 300 µl PBS - Puffer gewaschen, um die nicht gebundenen Bakterien zu entfernen.

Nur die an den pflanzlichen Substanzen in der Vertiefung adhärennten Bakterien überstehen gemäß diesem Modell die Waschung und können sich im Anschluss hieran vermehren. Die Platte wurde mit 300 µl BHI - Medium/Vertiefung befüllt und mit Deckel in einen Plattenleser (Photometer TECAN sunrise, Tecan Group Ltd., Crailsheim, Deutschland) mit der dazugehörigen Software (XFluor 4, Tecan Group Ltd., Crailsheim, Deutschland) bei 37 °C für 24h zur Messung gestellt. Die Messung erfolgt im Abstand von 5 min bei 620 nm. Die Zunahme der Absorption kennzeichnet die Vermehrung der adhärennten *E. coli* auf der mit Testsubstanzen beschichteten Platte. Das Verfahren ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 4):

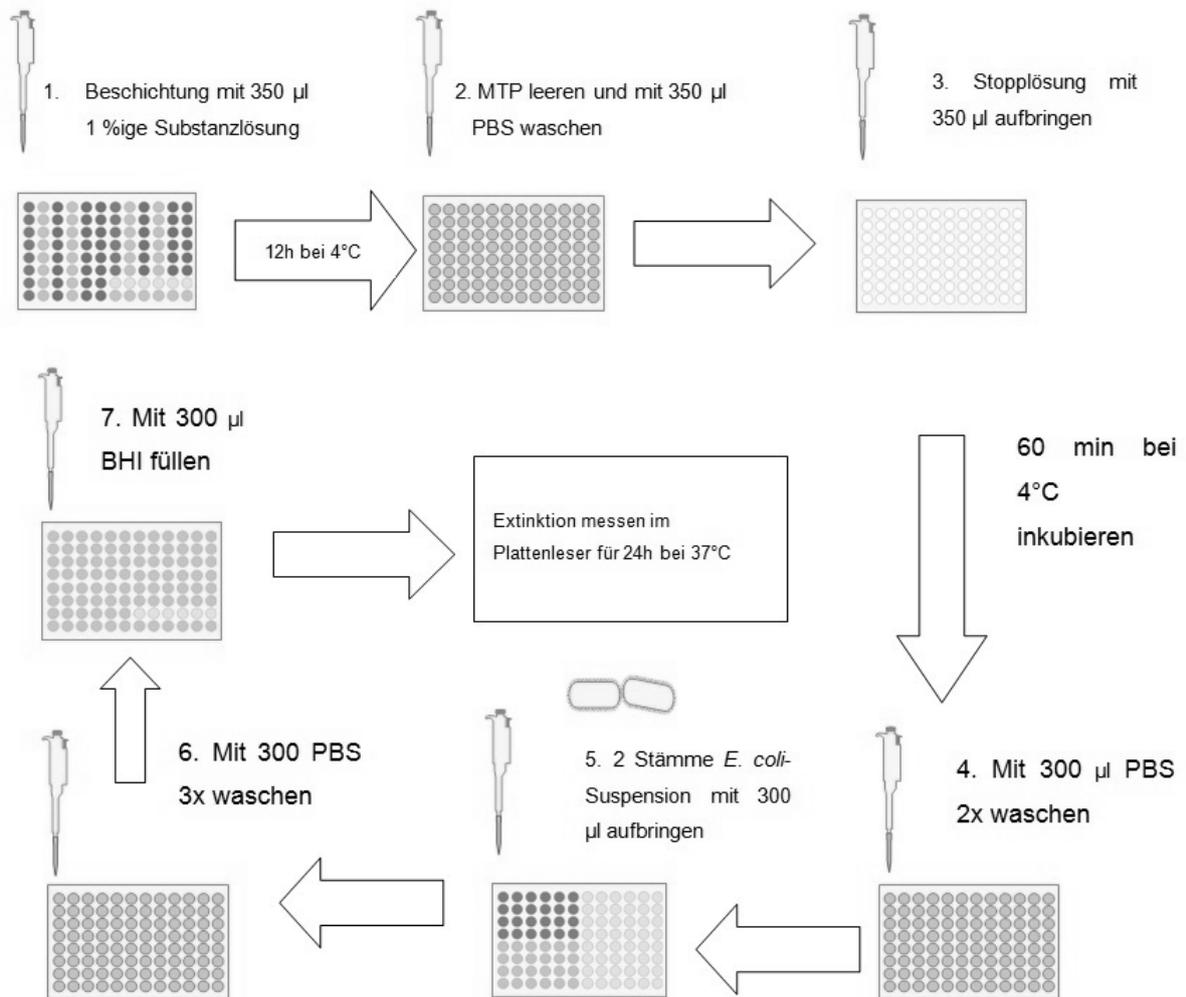


Abb. 4: Durchführung Adhäsionsversuch

Quelle Bildbausteine: Motifolio.com

Insgesamt wurden immer zwei aviäre *E. coli* Stämme pro Platte aufgetragen. Das Pipettierschema ist in der Abbildung 5 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AP	MP	G	P	MS	PBS	BHI	AP	MP	G	P	MS
B	AP	MP	G	P	MS	PBS	BHI	AP	MP	G	P	MS
C	AP	MP	G	P	MS	PBS	BHI	AP	MP	G	P	MS
D	AP	MP	G	P	MS	PBS	BHI	AP	MP	G	P	MS
E	AP	MP	G	P	MS	PBS	BHI	AP	MP	G	P	MS
F	AP	MP	G	P	MS	PBS	BHI	AP	MP	G	P	MS
G	AP	MP	G	P	MS	PBS	BHI	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
H	AP	MP	G	P	MS	PBS	BHI	BHI	BHI	BHI	BHI	BHI

AP = Apfelpektin; MP = Mangopektin; G = Glukose; P = Polyphenole; MS = Mangoschale; PBS = Phosphat-buffered-saline (Puffermedium 1); BHI = Brain-Heart-Infusion-Broth (Puffermedium 2), A1 - A7 bis D1 - D7 (Hellgrau) = *E. coli* Stamm 1, E1 - E7 bis H1 - H7 (Dunkelgrau) = *E. coli* Stamm 2, A8 - A12 bis H8 - H12 (Weiß) = Blanks

Abb. 5: Pipettierschema für den Adhäsionsversuch

Jede Messung wurde pro Stamm dreimal an verschiedenen Tagen wiederholt. Dabei war die Kombination von Bakterienstämmen randomisiert. Als Positivkontrolle dienten das BHI-Medium und Glukose, als Negativkontrolle unbeimpftes BHI-Medium und PBS-Puffer sowie alle Substanzen in unbeimpften Vertiefungen für den Abzug der Extinktion. Bei der Analyse der Messergebnisse wurden die Extinktionswerte der Negativkontrollen und des reinen BHI-Mediums berücksichtigt. Hierdurch wurden Wachstumskurven mit sigmoidalem Verlauf (siehe Abbildung 3) erstellt, anhand derer die reine Extinktionsänderung durch das Bakterienwachstum dargestellt und statistisch ausgewertet werden konnte. Bei einer eingestellten Ausgangskonzentration der hinzugegebenen *E. coli* von 10^8 Zellen/ml zeigte sich eine Zunahme der Extinktion nach 5 Stunden Inkubation. Dieser Zeitabschnitt wurde als die scheinbare Anlaufzeit definiert und grafisch ausgewertet. Die Höhe der Werte der maximalen optischen Dichte wurde als Maßstab herangezogen, um die Adhäsion der *E. coli* an die zu testenden Substanzen zu interpretieren. Bei der Auswertung zeigte sich, dass das Wachstum nach 10 Stunden eingestellt wurde. Die Höchstwerte waren somit zu diesem Zeitpunkt erreicht. Daher wurde bei den Berechnungen nur die Vermehrung der *E. coli* innerhalb von 10 h betrachtet. Hierfür wurde das Programm Sigma Plot 11 (Sigma Plot Version 11, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) benutzt.

3.2. Fütterungsversuche – Testung der Mangoschale als Futterzusatz bei Broilern

Für die Bewertung der potenziell positiven Wirkungen auf die Leistung und Entwicklung der Darmmikrobiota von Broilern wurden integrale und depektinisierte Mangoschalen als Futterkomponenten in einer Menge von 1 bis 2 % im Vergleich mit einer Kontrollgruppe ohne Pektine oder Mangoprodukten in der Futtermischung getestet. Der Tierversuch wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin mit der Genehmigungsnummer G 0320/12 bewilligt. Die Haltung, Fütterung und Probenentnahmen am Versuchsende erfolgten am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin.

3.2.1. Tierexperimentelle Methoden

3.2.1.1. Versuchstiere: Haltung, Anzahl und Herkunft

Es wurden 320 Masthähnchen in zwei Mastdurchgängen mit den Versuchsfuttermischungen gefüttert. In Durchgang 1 und 2 wurden jeweils 160 Tiere mit jeweils 8 Tieren pro Versuchseinheit randomisiert eingestallt (siehe Anhang A.4.1., Abbildung 6) und gleichmäßig auf alle 5 Fütterungsgruppen verteilt. Bei dem zweiten Durchgang wurden aufgrund einer fehlerhaften Anlieferung der Tieranzahl in 10 von 20 Boxen jeweils 7 Tiere anstelle von 8 eingestallt (siehe Anhang A.4.2., Abbildung 7). Aus der erfolgten Aufstallung ergab sich eine Anzahl an Wiederholungen pro Fütterungsgruppe von $n = 8$. Die Masthähnchen (Ross, Cobb 500) stammten aus einer kommerziellen Brüterei (Cobb Germany Avimex GmbH, Wiesenena-Wiedemar). Die Haltung erfolgte am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin in einer Stalleinheit mit Boxen in Bodenhaltung. Die einzelnen Boxen hatten eine Größe von 1,20 m × 1,75 m mit einem Einstreugemisch aus Sägespänen und Strohhecksel (GOLDSPAN®, Brandenburg Unternehmensgruppe, Goldenstedt, Deutschland). Die Temperatur betrug 33 °C für die ersten 7 Lebenstage, danach wurde sie alle 7 Tage um 3 °C bis auf 24 °C gesenkt. Das Lichtprogramm war für die ersten 3 Tage auf 24h/d eingeschaltet, um die Akklimation an den neuen Stall und die Orientierung der Tiere zu Tränken und Futternäpfen zu gewährleisten. Vom 4. bis zum 7. Lebenstag wurde das Lichtprogramm auf 20 h und vom 8. bis 35. Lebenstag auf 16 h umgestellt. Binnen der ersten 7 Lebenstage war zusätzlich je eine Rotlichtlampe/Box als zusätzliche Wärmequelle 24h eingeschaltet. Die Versuche wurden für den Durchgang 1 im November bis Dezember 2013 durchgeführt. Der zweite Versuch folgte im Frühjahr 2014 Ende Januar bis Februar. Diese beiden Durchgänge wurden für die Ermittlung der Metabolite sowie der Zusammensetzung der Mikroflora genutzt.

3.2.1.2. Fütterung und Tränkeeinrichtungen

Den Tieren standen pro Box frisches Wasser in einer Stülptränke (Siepmann GmbH, Herdecke, Deutschland) von Lebenstag 1 - 9 und fünf zusätzliche Nippeltränken während des gesamten Versuchs zur Verfügung. Der Wechsel von Stülptränken auf Nippeltränken erfolgte jeweils an Tag 9. Zuvor waren die Nippeltränken bereits in einer Höhe angebracht worden, bei der die Tiere Erfahrungen mit ihnen sammeln konnten.

Alle Tiere hatten freien Zugang zu den experimentellen mehlförmigen Futtermischungen (Zusammensetzung Tabelle 5). Die Erfassung des Futtermittels erfolgte bei jedem Nachwiegen. In der Starterfutterperiode (1 – 14 d) wurde ein Starterfutter verwendet, um ein optimales Wachstum und Entwicklung der Körpermuskulatur zu gewährleisten. Futterautomaten (Siepmann GmbH, Herdecke, Deutschland) dienten der Zuteilung. In der zweiten Fütterungsphase (15. – 35. Lebenstag) wurde ein Mastfutter gegeben.

3.2.1.3. Versuchsdurchführung

Die Zuteilung der Versuchsgruppen erfolgte randomisiert und es wurden Futtermischungen für die Kontrollgruppe A ohne Zusatz, für Versuchsgruppe B mit 1 % Mangoschale, für Versuchsgruppe C mit 1 % depektinierter Mangoschale, für Versuchsgruppe D mit 2 % Mangoschale und für Gruppe E mit 2 % depektinierter Mangoschale (siehe Tabelle 5) verfüttert. Die Erfassung der Körpermasseentwicklung erfolgte beim Einstellen und dann im wöchentlichen Abstand bis unmittelbar vor der Schlachtung. Täglich erfolgte die Gesundheitskontrolle durch die betreuenden Tierärzte und Tierpfleger. Die zu untersuchenden Gesundheitsparameter und die festgelegten Abbruchkriterien sind im Anhang unter A.3.1. dargestellt.

3.2.1.4. Leistungsparameter

Die Leistung der Tiere wurde kontinuierlich erfasst. Für die Erfassung der Tiergewichte wurden die einzelnen Tiergruppen wöchentlich gewogen (DE Plattformwaage DE12K1N, Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland). Der Futtermittelsverbrauch wurde durch Rückwaage des verbliebenen Futters an diesem Tag im Vergleich zum eingewogenen Futter erfasst und verstorbene Tiere hierbei berücksichtigt. Aus diesen Daten ließen sich die Körpermasse, die Futteraufnahme, die Zunahme und der Futteraufwand ermitteln. Die Formel für den Futteraufwand ist nachfolgend dargestellt.

$$\text{Mittlerer Futteraufwand} = \frac{\text{Mittlere Futteraufnahme (g)}}{\text{Mittlere Lebendmassezunahme (g)}}$$

Die Mortalität wurde während der gesamten Versuchsdauer protokolliert und nach Abschluss der Versuche an Tag 35 rechnerisch mit der nachfolgenden Formel bestimmt.

$$\text{Mortalitätsrate (in \%)} = \frac{(\text{Anzahl verstorbener Tiere/Versuchsdiät}) \times 100}{\text{Anzahl eingestellter Tiere/Versuchsdiät}}$$

3.2.2. Versuchsfutter und Fütterung

Die eingesetzten Mangoschalen (*Mangifera indica* L var. Alphonso, Herkunft: Indien) wurden freundlicherweise von Balmer Lawrie & Co.LTD zur Verfügung gestellt. Vor der Erstellung der Rezeptur für die Futtermischung wurden die Mangoschalen hinsichtlich ihrer Nährstoffwerte untersucht, die Ergebnisse sind im Anhang unter A.4.2. dargestellt. Mit der Durchführung der Schwermetall- und Pestizidanalysen wurde das SGS Institut Fresenius GmbH beauftragt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind im Anhang unter A.4.3. aufgeführt. Der Vergleich mit Mangoschalen ohne enthaltenes Pektin machte eine Depektinisierung mit Enzymen notwendig (siehe Anhang unter A.4.4).

Rezepturen für die Futtermischungen

Die Futtermischungen wurden nach der dargestellten Rezeptur (Tabelle 5) in Schrotform hergestellt. Die Fütterung wurde in zwei Intervalle eingeteilt. Vom 1. – 14. Lebenstag wurden ein Starterfutter und ab dem 15. – 35. Lebenstag das Mastfutter ad libitum gefüttert. Als Markersubstanz für die Verdaulichkeit wurde der unverdauliche Marker Titandioxid (Titan (IV) -oxid, Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in Höhe von 0,05 % dem Mastfutter zugesetzt. Die Zusammenstellung der Futtermittel ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Komponenten (in %) der Alleinfuttermittel für Broiler

Starterfutter (d 1 - 14)					
Bestandteile (g/kg)	Kontrolle	Mango 1 %	Dep. Mango 1 %	Mango 2 %	Dep. Mango 2 %
Mais	50,3	48,6	49,1	46,9	47,8
Sojaextraktionsschrot (44 % RP)	38,3	38,5	38,2	38,7	38,0
Kalziumkarbonat	1,46	1,44	1,44	1,42	1,43
Sojaöl	7,14	7,26	7,49	8,10	7,86
Methionin	0,16	0,16	0,17	0,17	0,18
Monokalziumphosphat	1,43	1,44	1,44	1,46	1,46
Vit. Mineralien*	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
Lysin	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05
Titan(ium)dioxid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mangoschale (in %)	0,00	1,00	0,00	2,00	0,00
Depektinisierte Mangoschale (in %)	0,00	0,00	1,00	0,00	2,00
Mastfutter (d 15 – 35)					
Bestandteile (g/kg)	Kontrolle	Mango 1 %	Dep. Mango 1 %	Mango 2 %	Dep. Mango 2 %
Mais	65,3	63,7	64,1	62,0	62,9
Sojaextraktionsschrot (44 % RP)	25,9	26,1	25,8	26,3	25,7
Kalziumkarbonat	1,13	1,12	1,12	1,10	1,11
Sojaöl	4,45	4,92	4,76	5,38	5,12
Monokalziumphosphat	1,14	1,14	1,15	1,15	1,16
Vit. Mineralien*	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
Methionin	0,20	0,21	0,21	0,21	0,22
Lysin	0,10	0,10	0,11	0,10	0,12
Threonin	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05
Titan(ium)dioxid	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mangoschale	0,00	1,00	0,00	2,00	0,00
Depektinisierte Mangoschale	0,00	0,00	1,00	0,00	2,00

*Herkunft Vitaminiertes Mineralfutter, Spezialfutter Neuruppin GmbH & Co. KG, Friedrich Bückling Straße 9; 16816 Neuruppin; Zusammensetzung des Vitaminfutterzusatzes: Phosphor 0,3 %, Magnesium 5,5 %, Natrium 13 %, Zusatzstoffe je kg: Vitamin A (E 672) 600.000 I.E., Vitamin D3 (E 671 aus Vitamin D3) 120.000 I.E., Vitamin E (all-rac-alpha-Tocopherylacetat 3a 700) 8000 mg, Vitamin K3 aus Menadion-Natriumbisulfit 300 mg, Vitamin B1 aus Thiaminhydrochlorid 250 mg, Vitamin B2 aus Riboflavin 250 mg, Vitamin B6 3a831 aus Pyridoxinhydrochlorid 400 mg, Eisen E 1 (Eisen-(II) -carbonat) 5000 mg, Kupfer E 4 (Kupfer-(II)-sulfat, Pentahydrat) 1000 mg, Zink E6 (Zinkoxid) 5000 mg, Vitamin B12 aus Vitamin B12 2000 µg, Nicotinsäure aus Nicotinsäure 3a314 2500 mg, Biotin aus Biotin 25000 µg, Folsäure aus Folsäure 3a316 100mg, Pantothenensäure aus Calcium-D-Pantothenat 1000 mg, Cholinchlorid aus Cholinchlorid 3a890 80000 mg, Mangan E 5 (Mangan-(II)-oxid) 6000 mg, Jod E 2 (Calciumjodat, wasserfrei) 45 mg, Selen E 8 (Natriumselenit) 35 mg.

Analyse der verwendeten Futtermittel

3.2.2.1. Weender Analyse

Zur Überprüfung der Rohnährstoffgehalte wurde die Weender Nährstoffanalyse durchgeführt (Methodenbuch III, Naumann und Bassler, Stand 2013). Sowohl das Futter als auch die Digestaprobe wurden zuvor gefriergetrocknet und auf eine einheitliche Partikelgröße von 0,5 mm mit einer Spurenelemente - neutralen Mühle (Spurenelemente - neutrale Mühle ZM 200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) vermahlen. Die Futtermittelanalytik erfolgte auf Basis der mit einem Beprobungsstab entnommenen Futtermittel eines jeden Durchganges.

Bestimmung des Rohwassergehalts/Trockensubstanz

Bei der Bestimmung der Trockensubstanz (TS) wurde nicht nur der Rohwassergehalt, sondern auch der Gehalt von allen flüchtigen Substanzen bis 103 °C bestimmt (Kamphues et al. 2014). Der zu verwendende Porzellantiegel war nummeriert und bei 120 °C 1 h vorgetrocknet. Das Gewicht des Tiegels wurde vor Einwaage der Proben erfasst (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und später abgezogen. Je 1 g gemahlene Futter bzw. 0,5 g Digesta (= E) wurde in den tarierten Porzellantiegeln eingewogen (= T1). Die Bestimmung erfolgte jeweils als Doppelbestimmung.

Die Probe wurde in dem Porzellantiegel für 4 h bei 103 °C im Trockenschrank (Lackrockenschrank LUT 6050 F, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) getrocknet und im Anschluss in einem Exsikkator abgekühlt. Nach dem Abkühlen der Proben wurde das Gewicht (T2) bestimmt, woraus sich der Rohwassergehalt bzw. der Gehalt der Trockensubstanz in g/kg Futtermittel berechnen ließ.

Berechnungen:

Trockensubstanz (in g/kg) = $((T2-T1) / E) * 1000$

Rohwasser (in g/kg) = $1000 - (((T2-T1) / E) * 1000)$

Bestimmung der Rohasche

Der Gehalt der Rohasche wurde im Anschluss an die Trockensubstanzbestimmung mit denselben Probenansätzen durchgeführt. Hierbei handelte es sich um die Bestimmung der Gewichtsanteile an anorganischen bzw. im Rückkehrschluss der organischen Substanzen der Futtermittel. Das Gewicht des Tiegels (T1) und der Probe (T2) waren bereits aus der Bestimmung der Trockensubstanz bekannt. Für die Bestimmung der Rohasche wurden die Proben aus der Trockensubstanzbestimmung über 12 h in einen Muffelofen (Heraeus® M 110, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) bei 600 °C verascht und im Anschluss in den Exsikkator zum Auskühlen verbracht. Die Proben wurden nach der Abkühlung zurückgewogen

(Wert T3) (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Der Gehalt der Rohasche ließ sich über das Eingangsgewicht (= E) ermitteln.

Berechnung:

Rohasche (in g/kg) = $((T3 - T1) / E) * 1000$

Bestimmung des Rohproteins

Das Prinzip der DUMAS-Methode beruhte auf der Erfassung der Wärmeleitfähigkeit mittels Makro-Elementaranalysator (Makro-Elementaranalysator vario MAX CN elementar, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Deutschland) während einer katalytischen Verbrennung und der Reduktion von stickstoffhaltigen Verbindungen zu Stickoxid (N₂). Bei der Bestimmung des Rohproteins nach der DUMAS-Methode wurden auch stickstoffhaltige Verbindungen ohne eine eiweißartige Natur nachgewiesen, hierzu zählten beispielsweise Alkaloide, Amine, freie Aminosäuren und andere Substanzen (Kienzle 2009). Jeweils 400 mg Futter bzw Digesta wurden abgewogen (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und in einer Doppelbestimmung vom Gerät analysiert. Die ausgewiesenen Gehalte an Stickstoff wurden mit dem Faktor 10 multipliziert, um den Gehalt an Rohprotein zu berechnen.

Bestimmung des Rohfetts

Bei den Analysen der Proben wurde nach institutsinternen Standards auf den Säureaufschluss verzichtet, da sich hierbei keine Unterschiede bei der Extraktion ergeben hätten. Es wurden ca. 1 g Probe (Futter bzw. Digesta (= E)) in spezielle dafür geeignete Filtertüchchen (Fat Filter Bags F57 (blau), Ankom Technologies, New York, USA) (Wert = T2) eingewogen (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und sorgfältig verschlossen. Hierauf folgte eine dreistündige Extraktion nach dem Prinzip von Soxhlet (Extraktionssystem B-811, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland) mit Petrolether (Petrolether, reinst, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), um das Fett herauszulösen. Es folgte eine Trocknung des verbliebenen Materials im Trockenschrank (Lacktrockenschrank LUT 6050 F, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) bei 103 °C für 30 min. Durch eine Rückwaage (= T2) der im Exsikkator abgekühlten Probe und rechnerische Ermittlung im Vergleich mit dem Eingangsgewichten konnte die Menge an entferntem Rohfett ermittelt werden.

Berechnung:

Rohfett in g/kg Probe = $((T2-T1) / E) * 1000$

Bestimmung der Rohfaser

Bei der Bestimmung der Rohfaser wurde ein Rohfaseranalysator (Ankom 2000 Fibre Analyser, ANKOM Technology, Macedon, USA) verwendet. Hierfür wurden 0,5 g des gemahlene Futters bzw. Digesta (= E) in ein Filtertütchen (Fat Filter Bags F57 (blau), Ankom Technologies, New York, USA) (= T1) eingewogen (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und verschlossen. Um das enthaltene Rohfett vorab zu entfernen, wurden die Proben für 10 min in 350 ml Petrolether (Petrolether, reinst, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) extrahiert und an der Luft getrocknet. In dem Gerät wurden die Proben mittels 1,25 %iger verdünnter Schwefelsäure (Schwefelsäure, 95-97 %, J.T.Baker, Deventer, Niederlande) gekocht und nach dem Absaugen der flüssigen Phase mit 1,25 %iger Natronlauge (Natronlauge 32 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gespült. Im Anschluss wurden die Proben mit heißem destilliertem Wasser (*Aqua bidest.*) gespült und mittels Papiertüchern vom restlichen Wasser größtenteils befreit. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min in Aceton (Aceton, reinst, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland, Karlsruhe) eingeweicht. Nachfolgend wurden die Proben für eine Stunde im Trockenschrank (Lackrockenschrank LUT 6050 F, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) bei 104 °C getrocknet, zum Abkühlen in einen Exsikkator verbracht und nach dem Abkühlen gewogen. Zum Veraschen im Muffelofen (Trockenschrank Heraeus Typ ST 5042, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) wurden Porzellantiegel vorgewogen, die abgewogenen Filtertütchen mit den enthaltenen Proben hineingegeben und bei 600 °C für 6 h verascht. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurden die Tiegel mit den Proben zurückgewogen und die zu ermittelnde Rohfaser rechnerisch bestimmt. Hierfür wurde das Gewicht der Rohasche vom Gewicht des getrockneten Inhalts der Filtertütchen abgezogen.

Berechnung:

$$\% \text{ Rohfaser} = ((w_3 - (w_1 * c_1)) / w_2) * 100$$

w1 = Gewicht der Filtertütchen in g

w2 = Probengewicht in g

w3 = Gewicht organische Substanz in g

c1 = Blindwertkorrektur (Filttertütchen nach Veraschung/ Filtertütchen)

3.2.2.2. Analyse der Aminosäuregehalte

Für die Analysen der Aminosäuren Methionin und Cystein ist vor dem Aufschlussverfahren eine Oxidation notwendig. Das weitere Analyseverfahren ist für alle Aminosäuren gleich. Die Herstellung der Oxidationslösung ist im Anhang unter A.4.5. nachlesbar.

Bestimmung von Methionin und Cystein

Für die Bestimmung von Methionin und Cystein mussten die Proben zunächst auf eine Partikelgröße von 0,5 mm vermahlen (Spurenelemente - neutrale Mühle ZM 200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) werden. Insgesamt 500 mg Digesta bzw. 500 mg Futter wurden in eine 100-ml-Schottglasflasche eingewogen (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und ein Rührkern wurde hinzugegeben. Fünf ml kalte (4 °C) frische Oxidationslösung wurde hinzugegeben und die Probe hiermit vollständig benetzt. Die Proben wurden in ein Eisbad gestellt und 24h im Kühlschrank (Kühlschrank Liebherr Profiline, LIEBHERR, Biberach an der Riß, Deutschland) bei 4 ° C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde 0,9 g Natriumdisulfit (Natriumdisulfit reinst, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland, Karlsruhe) hinzugegeben und die Oxidation hiermit abgebrochen. Es folgte die Hinzugabe der Hydrolysemischung (Herstellung siehe Anhang unter A.4.6.).

Bestimmung der Aminosäuregehalte

Bei den übrigen Aminosäuren, außer Methionin und Cystein, war eine Einwaage einer 500 mg Probe (Partikelgröße 0,5 mm) in eine 50-ml-Schottflasche (Schottflasche, SCHOTT AG, Mainz, Deutschland) notwendig. Fünfundzwanzig ml Hydrolysemischung wurden hinzugegeben und die Flaschen mit dem aufgelegten Deckel bei 110 °C eine Stunde lang im Trockenschrank (Lackrockenschrank LUT 6050 F, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) inkubiert. Nach Ablauf der Stunde wurden alle Flaschen mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen und weitere 23 h im Trockenschrank belassen. Die Proben wurden daraufhin luftgetrocknet und nachfolgend in ein Eisbad gestellt. Portionsweise wurde 20 ml Natronlauge (Natronlauge reinst (verdünnt auf 7,5 mol/l), Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland, Karlsruhe) in folgenden Schritten hinzugegeben: 2, 2, 4, 4, 5 und 5 ml. Während der Zugabe standen die Proben auf einem Magnetrührer (Magnetrührer IKA – RH – HAT/C, IKA® - Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) innerhalb eines Eisbades. Die Lösungen haben sich durch die Hinzugabe der Säure nicht über 40 °C erhitzt. Der pH-Wert wurde mittels Salzsäure (Salzsäure 37%ig, J.T.Baker, Deventer, Niederlande) und Natronlauge (Natronlauge, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland, Karlsruhe) auf 2,2 eingestellt. Die Lösungen wurden quantitativ nach der Abkühlung in einen 100-ml-Messkolben überführt. Dieser wurde mit einer Zitrat-Pufferlösung (2,2 pH, Herstellung siehe Anhang unter A.4.7.) aufgefüllt und der Inhalt gut gemischt. Hiervon wurden 2 ml in ein Eppendorfgefäß (Eppendorfgefäß, 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit einer Spritze (Injektionsspritzen, 2 ml, Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland) und einem Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm Cellulose-Acetatfilter, VWR International GmbH,

Darmstadt, Deutschland) membranfiltriert. Die Messung erfolgte im Aminosäureanalysator (Biochrom 20. Amersham Biosciences Corp., Freiburg, Deutschland).

3.2.2.3. Bestimmung der Mengenelemente

Die Mengenelemente Eisen, Kalium, Kalzium, Kupfer, Magnesium, Mangan, Natrium und Zink wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Hierfür wurde 1 g Futter bzw. 0,5 g Digesta in einen nummerierten Tiegel eingewogen (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und bei 550 °C im Muffelofen (Trockenschrank Heraeus Typ ST 5042, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) verascht. Danach wurden sie in ein 80-ml-Becherglas gegeben und mit jeweils 6 ml Salzsäure (Salzsäure, 37%ig, J.T.Baker, Deventer, Niederlande) sowie 20 ml *Aqua bidest.* vermenget. Die Proben wurden im Becherglas mit einem Uhrglas als Abdeckung bei 220 °C für 50 min im Sandbad (Sandbad, Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) erhitzt. Am Uhrglas kondensierte Flüssigkeit wurde mit *Aqua bidest.* wieder in die Lösung nach Abschluss des Sandbades gespült. Im Anschluss wurden die Proben mittels Blaubandfilter (Faltenfilter 595 ½ (Whatmann Schleicher und Schuell Ø 125 mm), Altmann Analytik GmbH & Co. KG, München, Deutschland) in einen 50-ml-Messkolben überführt und mit *Aqua bidest.* aufgefüllt. Bis zur Messung wurden sie in PE-Flaschen gefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Die Messung der Mineralstoffe erfolgte in einem Atomabsorbtienspektroskop (Atomabsorptionsspektrometer Vario 6, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland).

Bestimmung des Phosphorgehalts

Für die Bestimmung von Phosphat mussten vorerst einige Lösungen hergestellt werden. Dies ist im Anhang unter A.4.8. ausgeführt. Für die Bestimmung der Phosphatgehalte der Proben wurden 500 µl der Aschelösungen aus dem Mengenelementeaufschluss mit 5 ml einer Lösung aus 134 ml Salpetersäure (Salpetersäure (65 %), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) mit den Komplexbildnern Ammoniumvanadat (Ammoniumvanadat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zu 200 µl sowie Ammoniummolybdat (Ammoniummolybdat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zu 200 µl versetzt. Die Proben wurden im Anschluss mit *Aqua bidest.* auf 20 ml aufgefüllt. Das enthaltene Phosphat bildet mit den Komplexbildnern im sauren Milieu einen gelblichen Farbkomplex, dessen Extinktion photometrisch bei 436 nm im Photometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA) gemessen werden konnte. Eine Auswertung wurde anhand der mit der Kalibrierlösung (siehe Anhang unter A.4.8.) gemessenen Eichkurven durchgeführt.

3.2.2.4. Titanbestimmung

Der Marker Titan diente dazu, die Verdaulichkeit der Futterkomponenten zu ermitteln, da Titandioxid selbst nicht verdaut wird. Der Nachweis basiert auf dem Prinzip, dass durch einen Säureaufschluss mit einem Kjeldahlkatalysator und die nachfolgende Versetzung mit Wasserstoffperoxid zu einer Extinktion der Lösungen führt. Die Lösungen färbten sich je nach Gehalt an Titandioxid gelblich und der Farbumschlag wurde bei 420 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Herstellung des Standards für die Titanbestimmung ist im Anhang unter A.4.9. aufgeführt.

Aufarbeitung der Proben für die Titanbestimmung

Es wurden 200 mg Futter bzw. 100 mg Digesta in ein großes Glasröhrchen (Glasaufschlussgefäß, SCP Science, Courtaboeuf, Frankreich) eingewogen. Als interner Standard wurde zusätzlich ein Blindwert ohne Titangehalt in ein Röhrchen eingewogen. Es wurden 10 ml Schwefelsäure (Schwefelsäure 97 %, J.T. Baker, Deventer, Niederlande) hinzugefügt, zusätzlich wurden eine halbe Kjeldahl-Tablette (Kjeldahl Tablette 3,5 g/Tablette, Behr – Labortechnik GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und zwei Siedesteinchen (Siedesteinchen Sorte B, Behr – Labortechnik GmbH, Düsseldorf, Deutschland) hinzugegeben. Die Glasröhrchen wurden in das Aufschlussgerät (Heizblock: SCP Science DigiPREP HAT, S-prep GmbH, Überlingen, Deutschland) gestellt, diese verschlossen und die Proben bei 400°C für 95 min aufgeschlossen. In der Zwischenzeit wurden je Probe ein 25-ml-Messzylinder in ein Eisbad gestellt, mit einem Glastrichter, einem Filter (Faltenfilter 595 ½ (Whatmann Schleicher und Schuell Ø 125 mm, Altmann Analytik GmbH & Co. KG, München, Deutschland) und einem AAS-Probengefäß. Ein Becherglas wurde mit Eiswasser ebenfalls vorbereitet. Für den Standard (PerkinElmerPure: 100 mg/L, PerkinElmer Inc., Berlin, Deutschland) wurden ein 10-ml-Messkolben und vier Probengefäße für die Standardreihe benötigt. Nachdem die Aufschlüsse etwas abgekühlt waren, wurden sie in das Eisbad zur weiteren Abkühlung gestellt. Danach wurden die Proben durchmischt (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA) und mit Wasserstoffperoxid (Wasserstoffperoxid 30 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) quantitativ über einen weiteren Trichter in einen 25-ml-Messkolben auf Eis überführt. Die Proben wurden nach vollständigem Abkühlen auf 25 ml aufgefüllt und die Hälfte filtriert. Die Verdünnung des Standards fand mit dem Faktor 5 statt (2 ml Standard /10 ml Wasserstoffperoxid).

Messung der Proben

Das Spektralphotometer (Spektralphotometer Ultrospec 2100 pro, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA) wurde auf die Einstellung „SWIFT II Quantification“ eingestellt. Gemessen wurden zunächst der Blindwert und die Standardreihe. Hierfür wurden in Mikroküvetten 200 µl Wasserstoffperoxid (Wasserstoffperoxid 30 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) vorgelegt und danach die 2 ml Blindwert bzw. Standardlösungen (Herstellung siehe Anhang unter A.4.9) hinzugegeben. Kleine Luftblasen durften bei der Messung nicht vorhanden sein und mussten zuvor mittels Pipettenspitzen entfernt werden. Mit den Proben wurde anschließend nach demselben Schema fortgefahren. Der gemessene Gehalt an Titandioxid wurde dann mit dem Faktor 12,5 multipliziert, man erhielt die Konzentration von Titandioxid in µg/25 ml. Der erhaltene Wert wurde durch die Einwaage der Probenmenge am Anfang geteilt und man erhielt das Ergebnis in µg Titandioxid/g Probe. Die Konzentrationen an Titandioxid in den Proben von Ileum und Rektum im Vergleich mit den Rohnährstoffen ergaben, wie viel prozentual zwischen den beiden Darmabschnitten verdaut wurde.

3.2.2.5. Probenentnahmen

Am Sektionstag wurden unmittelbar vor der morgendlichen Schlachtung die Tiergewichte erfasst. Die Tiere bekamen das Futter nochmals frisch zugeteilt. Die Probenentnahmen begannen ca. 1 h nach Abschluss der Wiegungen um 8.00 h morgens. Jeweils am 35. Lebenstag wurden bei Durchgang 1 und 2 die Proben von jeweils 2 Einzeltieren (1 Tier als Reserve) des ersten und zweiten Durchganges als mikrobiologische Proben (1 Tier/Box) in Flüssigstickstoff weggefroren und danach bei – 80 °C bis zur weiteren Auswertung gelagert. Die Tiere wurden mittels eines stumpfen Schlages betäubt. Danach erfolgten unverzüglich der Blutentzug und die zervikale Dislokation. Die Tierkörper wurden unmittelbar nach der Tötung sezziert und die Proben in sterile Gefäße entnommen. Der Kropf wurde durch eine Erweiterung des Schnittes der zervikalen Dislokation freigelegt und durch einen Scherenschlag geöffnet und enthaltene Digesta direkt in die Probengefäße abgefüllt. Der Bauchraum wurde eröffnet und das Meckelsche Divertikel aufgesucht. Der Darm wurde direkt am Divertikel durchtrennt und der verbliebene Darmabschnitt inklusive der Blinddärme herausgelöst. Die Entnahme des Ileums erfolgte nach Kluth (Kluth et al. 2005). Hierbei wurde die Strecke vom Meckelschen-Divertikel bis 2 cm vor Endung in die Blinddärme herausgetrennt und nur die terminalen 2/3 wurden als Digestainhalt des Ileums beprobt. Das erste Drittel war als Jejunum definiert und wurde nicht beprobt. Die Blinddärme wurden an ihren Mündungen abgetrennt und beprobt. Es wurden Proben aus den Blinddärmen entnommen und alle Proben für die mikrobiologischen Untersuchungen in Eppendorfgläsern (Eppendorfgläser, 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff weggefroren. Das Rektum (ca. 1,5 - 2 cm Länge) wurde an der Übergangsstelle unmittelbar hinter den Blinddärmen abgetrennt. Es definierte sich als

kurze Strecke zwischen den Blinddärmen und der Kloake (König et al. 2001). Regelmäßig während des Schlachtvorgangs wurden die stickstoffgekühlten Proben in die Lagerung bei - 80°C weggefroren (Probenplan, siehe Tabelle 6).

Tab. 6: Probenplan für die mikrobiologischen Untersuchungen (qPCR)

Lokalisation	Menge ¹	Aufbewahrung Schlachtung	Lagerung
Kropf	2 x 2 ml	Flüssigstickstoff	- 80°C
Ileum	2 x 2 ml	Flüssigstickstoff	- 80°C
Zäkum	2 x 2 ml	Flüssigstickstoff	- 80°C
Rektum	2 x 2 ml	Flüssigstickstoff	- 80°C

¹ je 2 Einzeltierproben/Box, n =16

Proben für die Metabolite (1 Tier/Box) des ersten und zweiten Durchgangs wurden jeweils am 36. Lebenstag nach der Entnahme nach bereits genannten Verfahren direkt in Probengefäße (Greiner Röhrchen 15 ml, CELLSTAR®PP Test Tubes, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gefüllt, auf Eis gelagert und binnen 15 min bei - 20 °C bis zur weiteren Analyse weggefroren. Der Probenplan ist nachfolgend in Tabelle 7 dargestellt:

Tab. 7: Probenplan* für Messung der Metabolite

Lokalisation	Untersuchung	Gefäß	Lagerung
Kropf	pH, SCFA, Laktat	50 ml	-20°C
Ileum	pH, SCFA, Laktat, NH3	50 ml	-20°C
Zäkum	pH, SCFA, Laktat	50 ml	-20°C
Rektum	pH, Laktat, NH3, SCFA,	15 ml	-20°C

*Einzeltierproben, n = 8

3.2.2.6. Quantifizierung bakterieller Stoffwechselprodukte

Um zu klären, ob die Fütterung der Mangoschalen-Varianten präbiotische Wirkungen im Tierversuch entfaltet, wurden neben dem pH-Wert die mikrobiellen Stoffwechselprodukte Laktat, flüchtige Fettsäuren und Ammonium in der Digesta der Tiere von Durchgang 1 und 2 in Kropf, Ileum, Zäkum und Rektum analysiert.

3.2.2.6.1. Messung des pH-Wertes in der Digesta

Die Messung der pH-Werte in den Darmabschnitten Kropf, Ileum, Zäkum und Rektum wurde unverzüglich nach der Entnahme der Proben auf Eis mit der gleichen Methode, wie in 3.1.1. beschrieben, durchgeführt.

3.2.2.6.2. Messung des Gehalts an Laktat in der Digesta

Die Messung von D- und L-Laktat erfolgte mit einer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie-Anlage (HPLC-Anlage Agilent 1100, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland) nach der institutsinternen Arbeitsanweisung, wie auch von Ferrara (Ferrara 2012) genutzt. Hierfür wurde ein wässriger Extrakt der zu messenden Probe vom Gerät auf einer chiralen Säule (Phenomenex Chirex 3126 (D) – Penicillamine 150 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, USA) mit einer dazu geschalteten Vorsäule (Phenomenex C18 4.0 L mm x 2,0 ID mm, Phenomenex, Torrance, USA) getrennt und vom Gerät gemessen.

Die verwendeten Lösungen sind im Anhang unter A.5.1. dargestellt. Zur Bestimmung der D- und L-Laktatkonzentration wurden die eingefrorenen Proben auf Eis schonend aufgetaut und 0,5 g Digesta in ein neues Gefäß (Eppendorfgefäß 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingewogen (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Es wurde jeweils 1 ml Kupfer-II-Sulfatlösung (0,5 mM, Herstellung siehe Anhang unter A.5.1.) hinzugefügt, um die Milchsäure in Lösung zu bringen. Nach Durchmischung (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA) folgten 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (VV 3, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von je 100 µl Carrezlösung I und II (Herstellung siehe Anhang unter A.5.1.). Nach jeder Zugabe von Chemikalien wurden die Proben durchmischt und am Ende 10 min bei 14000 x g zentrifugiert (Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Der Überstand wurde mit einer 2-ml-Spritze (Injektionsspritzen, 2 ml, Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland) vorsichtig aufgezogen und durch einen sterilen Cellulose-Acetat-Spritzenvorsatzfilter (Cellulose-Acetat-Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) in ein neues steriles Eppendorfgefäß verbracht. Die Messung erfolgte nach Verdünnung (Tabelle 8) der aufgeschlossenen Proben mit Kupfer-II-Sulfatlösung (0,5 mM) in Glasgefäßen (Probengefäße Screw cap vials, Agilent Technologies Deutschland, Waldbronn, Deutschland).

Tab. 8: Herstellung der Probenverdünnungen zur Laktatmessung

Herkunft Digesta	µl Probengemisch	µl Kupfer-II-Sulfat (0,5mmol/l)
Kropf	100	900
Ileum	200	800
Blinddärme	200	300
Rektum	200	300

Zur Berechnung der Gehalte an Laktat wird der Verdünnungsfaktor X mit der Formel

$X = (\text{Einwaage} + 1,2) / \text{Einwaage}$ berechnet.

3.2.2.6.2. Ammonium

Die Messung der Ammoniumgehalte erfolgte wie unter Kapitel 3.1.1. beschrieben. Abweichungen hiervon werden im Folgenden genannt. Digesta von den Darmabschnitten Kropf, Ileum, Zäkum und Rektum wurde in Gefäße (Eppendorfgefäß 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingewogen (500 mg; Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und weggefroren (- 20 °C). Am Folgetag wurden die Proben maximal 15 min bei Raumtemperatur und im Anschluss langsam auf Eis aufgetaut. Insgesamt 1 ml des Verdünnungsmediums MOPS (pH 7,0; 100 mM, 4 °C) (Herstellung siehe Anhang unter A.2.2.) wurde hinzugegeben. Die Proben wurden für 1 min durchmischt (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA) und im Anschluss 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie bei 17.000 x g und 4°C zentrifugiert (Heraeus FRESCO 21 Centifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA). Der Überstand wurde in frische 2-ml-Eppendorfgefäße überführt. Hiervon wurde je nach Darmabschnitt ein unterschiedliches Mengenverhältnis von MOPS und Probe genutzt (Tabelle 9).

Tab. 9: Mischverhältnisse zur Messung von Ammonium

Darmabschnitt	Probenmenge in µl	MOPS (100 mM; pH 7) in µl
Kropf	10	70
Ileum	10	70
Zäkum	2	40
Rektum	2	40

Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Mikrotiterplatten vom Plattenleser ausgelesen und nach weiteren 5 min die zweite Messung mit den Geräten wie in Kapitel 3.1.1. durchgeführt.

3.2.2.6.3. Kurzkettige Fettsäuren

Die Bestimmung der von intestinalen Mikrobiota produzierten kurzkettigen Fettsäuren dient dazu, Rückschlüsse auf einen veränderten bakteriellen Stoffwechsel und daraus folgend eine Veränderung der Populationszusammensetzung im Darm der Tiere in-vivo festzustellen. Zu den zu quantifizierenden kurzkettigen Fettsäuren gehören Essigsäure, Propionsäure, i-Buttersäure, n-Buttersäure, i-Valeriansäure und n-Valeriansäure. Die Messung erfolgte nach dem gleichen Schema, wie unter 3.1.1 beschrieben. Abweichungen hiervon werden im Folgenden genannt. Aus den Digestaprobe von Kropf, Ileum, Zäkum und Rektum wurden jeweils 0,3 g in Gefäße (Eppendorfgefäß 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingewogen (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Die Verdünnungslösung (ISTD 0,5 mmol/l, Herstellung siehe Anhang unter A.1.3.) wurde mit einem Volumen von 1 ml auf die Proben aufgebracht und diese wurden im Anschluss für 60 min bei

Zimmertemperatur auf einen Schüttler (VV 3, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben zunächst bei 14.000 x g zentrifugiert (Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Der klare Überstand wurde in Glasgefäße (Probengefäße Screw cap vials, Agilent Technologies Deutschland, Waldbronn, Deutschland) abgefüllt und mit der ISTD (0,5 mmol/l, Herstellung siehe Anhang unter A.1.3.) verdünnt und im Anschluss durchmischt. Die Mischungsverhältnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Mischtablette für die Auswertung der flüchtigen Fettsäuren

Herkunft Digesta	µl Probenmenge	µl ISTD (0,5 mmol/l)
Kropf	400	400
Ileum	400	400
Zäkum	100	900
Rektum	50	350

3.2.2.7. Quantitative Erfassung der Bakteriengruppen in der Digesta

Die Methode zur quantitativen Erfassung der Laktobazillen in der Digesta wurde auf Basis der internen Arbeitsanweisung durchgeführt. Es bestehen bereits Veröffentlichungen (Ferrara 2012, Goodarzi Borojani et al. 2014). Die Durchführung der quantitativen Real-Time PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)) ermöglicht die Erfassung und Quantifizierung von doppelsträngigen Nukleotidsequenzen der zu testenden DNA-Extrakte. Hierfür wurden gruppenspezifische Primer (Definition siehe Anhang unter A.5.2.) für Digestaprobe aus Masthähnchen verwendet. Um die Vermehrung der PCR-Produkte zu quantifizieren, wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (Stratagene Brilliant II Sybr®Green Q-PCR, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland) verwendet, dessen Fluoreszenz proportional zur Bildung des PCR-Produktes zunimmt. Die Intensität der Fluoreszenz wurde dabei vom Gerät (Stratagene Mx3000P QPCR System, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mittels der Software (MxPro QPCR Software, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) erfasst. Daraus ergibt sich im Verlauf der Messung eine Amplifikationskurve, deren sigmoidaler Verlauf Rückschlüsse auf die Anzahl der vermehrten DNA-Sequenzen zulässt und somit die Population von Bakteriengruppen im Darmabschnitt indirekt messbar macht. Alle verwendeten Reagenzien und Materialien sind steril und frei von RNase vor der Analyse der Digestaprobe gewesen.

Aufbereitung der Digestaprobe

Die Aufbereitungen der Digestaprobe für die qPCR erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers des DNA-Extraktionskits (QIAamp DNA stool sample extraction Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Dazu wurden zunächst 200 mg Probenmaterial der verschiedenen Digestaprobe in 2 ml sterile Gefäße (Eppendorfgläser, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingewogen (Waage Genius Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und gemäß der Empfehlung des Herstellers (siehe Anhang unter A.5.3.) aufgearbeitet. Im Anschluss an die Extraktion wurden die genauen DNA-Gehalte mit dem Fluorospektrometer (NanoDrop ND3300, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) bestimmt. Die Herstellung der verschiedenen Arbeitslösungen ist im Anhang unter A.5.4.-A.5.7. und des Standards auf der Basis von Kalbsthymus-DNA (Kalbsthymus DNA Type XV, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) ist im Anhang unter A.5.4. dargestellt. Die DNA-Extrakte der Digesta-Proben aus Kropf, Ileum und Zäkum wurden immer zu 10 Stück für die Messung vorbereitet. Die Messung der DNA-Konzentration in den Extrakten wurde durch Hinzugabe eines fluoreszierenden Farbstoffes (Hoechst Dye 33258, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), der seine Fluoreszenz beim Kontakt mit doppelsträngiger DNA entfaltet, durchgeführt. Hierfür wurden die Extrakten mit dem verdünnten Farbstoff (100 µg/ml Hoechst Dye 33258, Verdünnung siehe Anhang unter A.5.5.) und ggf. mit dem TNE-Puffer (1x, Herstellung siehe Anhang unter A.5.6.) in lichtundurchlässigen Gefäßen (Reaction Tubes, schwarz, 1,5 ml für PCR, graduated, attached cap, natural, non-pyrogenic, human DNS – free, RNase und DNSase free, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemischt. Das Mischungsverhältnis ist für die DNA-Extrakte der Darmabschnitte nachfolgend in Tabelle 11 dargestellt:

Tab. 11: Mischtablette für Analyse der DNA- Gehalte in µl

Darmabschnitt	DNA-Extrakt	TNE-Puffer	Farbstoff
Kropf	4	8	12
Ileum	6		6
Zäkum	2	18	20

Die Messfläche des Nanodrop-Gerätes wurde mit Spezialwachs (Rekonditionierungskit Peqlab # 91-ND-PR1-KIT, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) vorbehandelt, damit die Probe mit einem Volumen von 2 µl in Form eines kugelförmigen Tropfens aufgebracht (Eppendorf Pipette Typ Reference 0,5-10 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und gemessen werden konnte. Die Messwerte konnten auf Basis der zuvor gemessenen Standardkurve der Kalibrierwerte von DNA aus Kalbsthymus interpretiert werden. Der Gehalt

an DNA wurde anschließend durch Hinzugabe von RNase freiem Wasser auf folgende Gehalte äquimolar eingestellt (Tabelle 12):

Tab. 12: Gehalt an DNA für Messung der qPCR

Darmabschnitt	DNA-Gehalt ng/µl
Kropf	0,71
Ileum	0,11
Zäkum	0,16

Hierbei orientierte sich die einzustellende Menge an dem niedrigsten gemessenen Gehalt der Proben eines jeden Darmabschnittes.

Quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration

In den erhaltenen Probenverdünnungen konnten nun mittels eines Stratagene Mx3000P qPCR Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und der Software (MxPro qPCR Software, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) die Gehalte an Laktobazillen, Enterobakterien und Clostridien gemessen (siehe Anhang unter A.5.8.) werden. Der durch die Analysen voreingestellte DNA-Gehalt wurde mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffes (Stratagene Brilliant II Sybr®Green Q-PCR, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland) und mittels der Software (MxPro qPCR Software, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) quantifiziert. Der fluoreszierende Farbstoff wurde hierfür mit RNase freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und der Mastermix (Master Mix with low ROX (Katalognr. 600830), QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) hinzugegeben. Die Konzentration der Primer lag bei Laktobazillen bei 0,4 µM, bei allen anderen bei 0,2 µM. Die Berechnung für das Mischverhältnis für die Probenanalyse ist nachfolgend dargestellt.

Berechnung

Anzahl der Proben x 25 µl +10 % ergibt das benötigte Gesamtvolumen **X**.

$X/2 = \mu\text{l}$ benötigte Menge Mastermix **A**

$X/50 = \mu\text{l}$ Primer 1 **B** (für 0,2 µM)

$X/50 = \mu\text{l}$ Primer 2 **C** (für 0,2 µM)

$X - (A + B + C) = \mu\text{l}$ RNase freies Wasser

Die Kalibrierreihe wurde bei jeder Messung erneut hergestellt und ging von 4 bis 9 ng/µl. Insgesamt 24 µl des hergestellten Mastermixgemisches inkl. der spezifischen Primer (siehe Anhang unter A.5.7.) wurden mit 1 µl eingestelltem DNA-Extrakt in geeignete Gefäße (Optical

Tube (PCR-Gefäße), Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland) gefüllt, verschlossen (Optical Caps (PCR-Verschlüsse), Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland) und nachfolgend zentrifugiert (VWR Mini Star Silverline, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Analysen des Gerätes wurden mit den Einstellungen, welche im Anhang unter A.5.8. dargestellt sind, durchgeführt. Die Anzahl der DNA-Kopien pro g Probe ließ sich anhand der Kalibrierreihe bestimmen und wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und durch die Einwaage dividiert.

3.2.3. Tierexperimentelle Methoden zur Bestimmung der Verdaulichkeit

3.2.3.1. Versuchstiere: Anzahl und Herkunft

Es wurden 20 Tiere pro Fütterungsgruppe untersucht.

3.3.3.4. Probenentnahmen

Als experimentelle Einheit für die Bestimmung der Verdaulichkeit wurden jeweils zwei Tiere gepoolt, es ergab sich somit eine Anzahl an Wiederholungen von $n = 10$. Nach der Entnahme von Digesta aus Kropf, Ileum, Zäkum und Rektum wurden die Poolproben beider Tiere gewogen und bei -20 °C bis zur späteren Analyse weggefroren. Es folgte die Gefriertrocknung (Alpha 1-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) und die Vermahlung (Spurenelemente neutrale Mühle ZM 200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) bis zur weiteren Analyse.

3.3.3.4. Probenentnahmen

Als experimentelle Einheit für die Verdaulichkeit wurden jeweils immer zwei Tiere pro Box gepoolt, bei 20 Tieren/Versuchseinheit ergab sich eine Anzahl an Wiederholungen von $n = 10$. Die Probenentnahme in 50-ml-Gefäße (Greiner Röhrchen 50 ml, CELLSTAR®PP Test Tubes, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) war identisch mit den vorangegangenen Durchgängen (unter 3.2.2.5. beschrieben). Nach der Entnahme von Digesta aus Kropf, Ileum, Zäkum und Rektum wurden die Poolproben zweier Tiere gewogen und bei -20 °C bis zur späteren Analyse weggefroren. Es folgte die Gefriertrocknung (Alpha 1-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) und die Vermahlung (Spurenelemente neutrale Mühle ZM 200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) bis zur weiteren Analyse.

3.3.2.5. Weender- bzw. Roh Nährstoffanalyse für die Bestimmung der präzäkalen Verdaulichkeit

Für die Ermittlung der präzäkalen Verdaulichkeit von Aminosäuren und Protein wurden dieselben Analyseverfahren durchgeführt, wie unter 3.3.1.4. beschrieben. Zur Ermittlung der Verdaulichkeit wurden die Gehalte an Inhaltsstoffen von Ileum und Rektum durch das enthaltene Titandioxid in Bezug gesetzt.

Berechnung der präzäkalen Verdaulichkeit:

$$\text{Verdaulichkeit \%} = 100 - \left(\frac{\text{Ti Digesta } \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}}\right)}{\text{Ti Futter } \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}}\right)} \times \frac{\text{Rohnärstoffe Digesta } \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}}\right)}{\text{Rohnärstoffe Futter } \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}}\right)} \right) \times 100$$

Ti = Titandioxid

3.2.4. Statistik

Die rechnerische Ermittlung der Mittelwerte und die grafischen Darstellungen erfolgten mit Excel (Excel 2007, Microsoft, Redmond, USA). Die Daten wurden weiterhin mit IBM Statistics (SPSS Version 21, SPSS Inc., Chicago, USA) ausgewertet. Zunächst wurden die Häufigkeiten überprüft sowie die Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test untersucht. Da eine Normalverteilung gegeben war, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei 0,05. Um mögliche Signifikanzen zwischen den Gruppen oder den Durchgängen zu ermitteln, wurde der Post-Hoc Test Tukey durchgeführt. Die Kennzeichnung der abzusichernden Unterschiede erfolgte durch Superskripte in den Tabellen.

4. Ergebnisse

Zunächst sollen die Ergebnisse der In-vitro-Versuche kurz zusammengefasst werden. Gefolgt von den Ergebnissen der Futtermittelanalytik (Weender-Analyse). Die Ergebnisse der in-vivo-Untersuchungen sollen im Anschluss kurz dargestellt werden.

4.1. In-vitro-Untersuchungen

4.1.1. Charakterisierung einer präbiotischen Wirkung mittels semi-kontinuierlichen Fermentationssystemen

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Testsubstanzen die Produktion verschiedener Metaboliten durch Zäkumbakterien nachhaltig beeinflussen konnten. Für den Nachweis eines Einflusses auf die mikrobielle Fermentation wurde der pH-Wert, der Gehalt an Ammonium sowie die Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren der Probenansätze bestimmt, die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Der pH-Wert wurde in allen Testansätzen beeinflusst ($p < 0,001$), den höchsten pH-Wert zeigten die Inkubationsansätze mit Zugabe von Apfelpektin (pH 6,36), die sich abgesichert von allen anderen Substratzugaben unterschieden. Bei den Testansätzen von Mangopektin zeigte sich ein pH-Wert im mittleren Bereich (pH 6,19), der unterschiedlich zu allen anderen Substanzen war. Die als Kontrollsubstrat eingesetzte Glukose (pH 5,86) führte zu einem sehr starken pH-Wert-Abfall, der gegenüber den pH-Werten von allen anderen Substraten abzusichernde Unterschiede aufwies. Die Zugabe von Polyphenolen bewirkte nur eine moderate pH-Reduktion (pH 6,27), die Ansätze unterschieden sich nicht signifikant von denjenigen mit Mangoschale (pH 6,30).

Der Ammoniumgehalt konnte durch die Substanzen während der Kurzzeitinkubation ebenfalls ($p < 0,002$) beeinflusst werden. Bei Zusatz von Mangopektin (1909 μM) und Glukose (1622 μM) ergaben sich deutlich geringere Werte als bei Zugabe von Apfelpektin (4416 μM). Bei den Testansätzen mit Mangoschale (2822 μM) und Polyphenolen (2413 μM) ergaben sich gegenüber den anderen Substraten keine Unterschiede.

Die Messung der SCFA konnte nur drei verschiedene Säuren in den Hungate-Röhrchen nachweisen. Dabei konnten Unterschiede bei den Konzentrationen von Essig- ($p < 0,001$) bzw. n-Buttersäure ($p < 0,001$) zwischen den verschiedenen Substanzen ermittelt werden (Tabelle 13). Propionsäure war in geringen Konzentrationen nachweisbar, die Differenzen zwischen den Ansätzen waren aber nur gering ($p < 0,121$). Von der Reihenfolge der Gehalte an Essigsäure zeigten die Testansätze mit Mangopektin (95,1 mmol/l) die höchste Produktion, gefolgt von Glukose (91,4 mmol/l), Apfelpektin (88,4 mmol/l), Mangoschale (76,4 mmol/l) und Polyphenolen (68,1 mmol/l). Bei der Essigsäure waren Apfelpektin, Mangopektin und Glukose

unterschiedlich zu den eingesetzten Mangopolyphenolen. Die Ansätze mit Mangoschale unterschieden sich zu denen mit Mangopektin und Glukose. Bei der n-Buttersäure konnten verschiedene abzusichernde Unterschiede festgestellt werden. Glukose (33,3 mmol/l) als Testansatz wies die höchsten Werte auf, die Differenzen waren zu allen anderen Ansätzen abzusichern. Mangoschale (15,1 mmol/l) zeigte ebenfalls unterschiedliche Werte gegenüber allen Substanzen bis auf Mangopektin (12,0 mmol/l). Mangopolyphenole (9,39 mmol/l) und Apfelpektin (8,10 mmol/l) waren gegenüber allen Substanzen bis auf Mangopektin unterschiedlich. Apfelpektin und Mango-Polyphenole zeigten nach Zugabe zu den Testansätzen kaum einen Anstieg der n-Buttersäure. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Mittlere Werte der Metaboliten der Kurzzeitinkubation mit den fünf Testsubstanzen und von Broilern stammendem Zäkuminhalt als Inokulum (Mittelwert \pm Standardabweichung)

	AP	MP	G	P	MS	gesamt	p-Wert
pH-Wert	6,36 ($\pm 0,05$) ^A	6,18 ($\pm 0,04$) ^C	5,86 ($\pm 0,03$) ^D	6,27 ($\pm 0,05$) ^B	6,30 ($\pm 0,04$) ^B	6,19 ($\pm 0,18$)	0,000
Ammonium*	4416 (± 531) ^A	1909 (± 2993) ^B	1622 (± 720) ^B	2413 (± 657) ^{AB}	2822 (± 618) ^{AB}	2636 (± 1705)	0,002
Essigsäure ⁺	88,4 ($\pm 4,46$) ^{AB}	95,1 ($\pm 12,4$) ^A	91,4 ($\pm 15,2$) ^A	68,1 ($\pm 9,84$) ^C	76,4 ($\pm 6,50$) ^{BC}	83,9 ($\pm 14,3$)	0,000
Propionsäure ⁺	2,64 ($\pm 0,13$)	3,23 ($\pm 0,51$)	3,43 ($\pm 1,37$)	3,22 ($\pm 0,36$)	3,47 ($\pm 0,48$)	3,20 ($\pm 0,74$)	0,121
n-Buttersäure ⁺	8,10 ($\pm 0,93$) ^C	12,0 ($\pm 2,49$) ^{BC}	33,3 ($\pm 6,18$) ^A	9,39 ($\pm 2,51$) ^C	15,1 ($\pm 3,90$) ^B	15,6 ($\pm 9,90$)	0,000

AP = Apfelpektin; MP = Mangopektin; G = Glukose; P = Mangopolyphenole; MS = Mangoschale; n = Anzahl gültiger Fälle; * = μM ; + = mmol/l; einzelne Metaboliten n = 9; Gesamt n = 45; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau $< 0,05$); Großbuchstaben als Superskripte kennzeichnen statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den Gruppen, Daten weisen eine Normalverteilung auf

4.1.2. Charakterisierung von Adhäsionseffekten pflanzlicher Extrakte auf ausgewählte aviäre *E. coli*

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz aller Testsubstanzen zu einer Steigerung der Extinktion und damit zu einer Adhäsion von verschiedenen Stämmen aviärer *E. coli* führte. Die scheinbare Anlaufzeit bis zu einer Steigerung der Extinktion betrug 5,03 – 6,20 Stunden, abhängig vom ausgewählten *E. coli*-Stamm. Es konnten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Substanzen festgestellt werden. Die maximale optische Dichte war bei dem Stamm IMT 11863 mit 0,73 bei Beschichtung mit Apfelpektin, Mangopektin und Mangoschale zu verzeichnen, es konnten keine Unterschiede (p-Wert = 0,201) zwischen den Testsubstanzen nachgewiesen werden. Die festgestellte Extinktion war vorrangig von dem

eingesetzten Stamm von *E. coli* abhängig. Nach 10 h war das logarithmische Wachstum abgeschlossen, weshalb die Wachstumsparameter bis zu diesem Zeitraum ausgewertet wurden. Statistisch zeigte sich beim Stamm IMT 11863 mit Apfelpektin ein schnelleres Wachstum ($p = 0,004$) gegenüber der Positivkontrolle BHI und nach Zugabe von Polyphenolen und Mangoschalen. Gegenüber dem Mangopektin und der Glukose ergaben sich keine Unterschiede. Mit BHI und Mangoschalen sowie bei Zugabe von Polyphenolen zeigte sich ein geringerer Anstieg der Extinktion (Tabelle 14).

Tab. 14: Mittlere bakterielle Wachstumsparameter (MW±Standardabweichung.) der Adhäsionsversuche

E. coli	Substanz (n=3)						p-Werte	
	BHI	AP	MP	G	P	MS		
	OD (620 nm)	0,62 (±0,07)	0,57 (±0,04)	0,63 (±0,03)	0,59 (±0,07)	0,60 (±0,06)	0,62 (±0,07)	0,805
IMT 15146	Spez. Wachstum	0,60 (±0,05)	0,67 (±0,02)	0,69 (±0,01)	0,60 (±0,04)	0,64 (±0,05)	0,58 (±0,06)	0,056
	Scheinbare Anlaufzeit	5,51 (±0,66)	6,01 (±0,61)	5,53 (±0,49)	5,51 (±0,77)	5,32 (±0,46)	5,18 (±0,35)	0,623
	OD (620 nm)	0,63 (±0,13)	0,60 (±0,02)	0,59 (±0,10)	0,61 (±0,12)	0,60 (±0,11)	0,62 (±0,13)	0,997
IMT 2271	Spez. Wachstum	0,66 (±0,01)	0,65 (±0,03)	0,66 (±0,03)	0,65 (±0,04)	0,65 (±0,02)	0,65 (±0,01)	0,971
	Scheinbare Anlaufzeit	5,05 (±0,31)	5,53 (±0,14)	5,47 (±0,50)	5,31 (±0,86)	5,19 (±0,46)	5,27 (±0,39)	0,857
	OD (620 nm)	0,60 (±0,06)	0,53 (±0,11)	0,56 (±0,09)	0,58 (±0,06)	0,57 (±0,06)	0,61 (±0,11)	0,851
IMT 9241	Spez. Wachstum	0,70 (±0,05)	0,64 (±0,06)	0,67 (±0,09)	0,68 (±0,05)	0,65 (±0,06)	0,64 (±0,05)	0,838
	Scheinbare Anlaufzeit	5,03 (±0,33)	5,35 (±0,24)	5,12 (±0,24)	5,38 (±0,29)	5,19 (±0,30)	4,95 (±0,36)	0,442
	OD (620 nm)	0,61 (±0,11)	0,58 (±0,15)	0,60 (±0,10)	0,61 (±0,08)	0,62 (±0,06)	0,62 (±0,07)	0,997
IMT 2358	Spez. Wachstum	0,70 (±0,09)	0,68 (±0,09)	0,68 (±0,08)	0,66 (±0,06)	0,66 (±0,05)	0,67 (±0,05)	0,984
	Scheinbare Anlaufzeit	5,06 (±0,30)	5,32 (±0,26)	5,23 (±0,17)	5,33 (±0,21)	5,28 (±0,40)	5,01 (±0,19)	0,576
	OD (620 nm)	0,71 (±0,01)	0,73 (±0,01)	0,73 (±0,01)	0,69 (±0,04)	0,71 (±0,02)	0,73 (±0,01)	0,201
IMT 11863	Spez. Wachstum	0,54 (±0,01) ^B	0,68 (±0,08) ^A	0,58 (±0,04) ^{AB}	0,56 (±0,05) ^{AB}	0,54 (±0,04) ^B	0,49 (±0,03) ^B	0,004
	Scheinbare Anlaufzeit	5,48 (±0,38)	6,20 (±0,53)	0,53 (±0,17)	5,95 (±0,26)	6,10 (±0,08)	5,90 (±0,24)	0,152

BHI = Brain-Heart-Infusion-Broth; AP = Apfelpektin; MP = Mangopektin; G = Glukose; P = Mangopolyphenole; MS = Mangoschale, n = Anzahl gültiger Fälle; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau <0,05); Großbuchstaben als Superskripte kennzeichnen statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den Gruppen, Daten weisen eine Normalverteilung auf, OD (620nm): maximale Optische Dichte bei 620 nm.; Spezifisches Wachstum: Faktor (Proportionalitätskonstante), mit dem sich die Zellmasse pro Zeiteinheit (h) teilt; scheinbare Anlaufzeit: Zeit in Stunden, bis die Wachstumstangente die x-Achse schneidet inklusive einem kleinem Extra abhängig von der Steigung einer Hilfstangente und somit eine messbare Extinktionszunahme beginnt (Pirt 1975).

4.2. Fütterungsversuche

4.2.1. Versuchsfutter und Fütterung

4.2.1.1. Voruntersuchungen zur Eignung der Mangoschalen

Die Ergebnisse der Weender Analyse wurden für depektinisierte und integrale Mangoschalen im Anhang unter A.4.2. dargestellt. Durch die enzymatische Depektinisierung wurden die Gehalte unterschiedlicher Nährstoffe nachhaltig beeinflusst. Das Verfahren ist im Anhang unter A.4.4. eingehend beschrieben. Die Rezeptur der Futtermischungen wurde isokalorisch und isonitrogen eingestellt, um Leistungsunterschiede aufgrund unterschiedlicher Energie- und Proteingehalte zu vermeiden. Die Zusammensetzung der Versuchsdäten ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tab. 15: Analysierter Nährstoffgehalt in den Diäten

Nährstoff	Einheit	Starterfutter					Mastfutter				
		Fütterungsgruppe									
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Trockenmasse	(g/kg Futter)	924	920	925	926	917	909	911	949	909	906
Rohasche	(g/kg TM)	58,0	58,0	57,0	58,0	58,0	50,0	50,0	54,0	51,0	49,0
Rohprotein	(g/kg TM)	233	233	229	230	228	182	191	184	190	179
Rohfett	(g/kg TM)	104	100	91,0	98,0	92,0	65,0	76,0	72,0	75,0	73,0
Stärke	(g/kg TM)	284	284	284	277	273	357	364	364	354	353
Rohfaser	(g/kg TM)	26,0	25,0	29,0	27,0	31,0	24,0	25,0	27,0	26,0	31,0
Alanin	(g/100 g Futter)	0,94	1,06	1,04	1,05	0,98	0,88	0,87	1,01	0,86	0,77
Arginin	(g/100 g Futter)	1,42	1,48	1,45	1,46	1,34	1,09	1,09	1,40	1,11	0,93
Asparaginsäure	(g/100 g Futter)	2,11	2,30	2,26	2,28	2,09	1,71	1,73	2,22	1,74	1,50
Cystein	(g/100 g Futter)	0,62	0,55	0,62	0,57	0,55	0,49	0,47	0,54	0,48	0,48
GaBa	(g/100 g Futter)	0,02	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Glutaminsäure	(g/100 g Futter)	2,00	2,16	2,13	2,14	2,08	1,91	1,85	2,10	1,83	1,67
Glycin	(g/100 g Futter)	0,80	0,90	0,88	0,89	0,84	0,71	0,70	0,86	0,70	0,63
Histidin	(g/100 g Futter)	0,80	0,88	0,86	0,87	0,80	0,68	0,60	0,75	0,61	0,53
Isoleucin	(g/100 g Futter)	0,74	0,83	0,80	0,81	0,77	0,62	0,63	0,82	0,64	0,54
Leucin	(g/100 g Futter)	1,62	1,68	1,65	1,68	1,57	1,41	1,40	1,62	1,37	1,21
Lysin	(g/100 g Futter)	1,23	1,32	1,28	1,29	1,20	1,01	1,01	1,26	1,04	0,88
Methionin	(g/100 g Futter)	0,64	0,53	0,61	0,55	0,55	0,53	0,52	0,53	0,51	0,57
Ornithin	(g/100 g Futter)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Phenylalanin	(g/100 g Futter)	1,04	1,12	1,10	1,10	1,02	0,86	0,85	1,07	0,85	0,73
Prolin	(g/100 g Futter)	1,26	1,31	1,24	1,25	1,13	1,06	1,02	1,15	0,96	0,85
Serin	(g/100 g Futter)	1,10	1,21	1,20	1,21	1,11	0,94	0,93	1,18	0,93	0,81
Taurin	(g/100 g Futter)	0,16	0,21	0,20	0,20	0,19	0,24	0,23	0,20	0,22	0,20
Threonin	(g/100 g Futter)	0,85	0,93	0,90	0,91	0,84	0,73	0,72	0,90	0,76	0,65
Tyrosin	(g/100 g Futter)	0,66	0,74	0,73	0,73	0,67	0,58	0,56	0,71	0,54	0,48
Valin	(g/100 g Futter)	0,80	0,90	0,87	0,89	0,85	0,72	0,72	0,88	0,74	0,63
P	(g/kg TM)	5,00	5,40	5,00	5,50	5,00	5,20	5,20	5,20	5,20	5,00
Ca	(g/kg TM)	9,10	8,70	8,80	9,00	9,00	7,30	7,40	7,60	7,10	7,10
Mg	(g/kg TM)	2,40	2,40	2,40	2,30	2,40	2,30	2,30	2,30	2,30	2,10
Na	(g/kg TM)	1,60	1,30	1,50	1,50	1,40	1,60	1,60	1,60	1,60	1,70
K	(g/kg TM)	8,10	8,50	8,30	8,50	8,00	6,30	6,60	6,40	6,70	6,30
Mn	(mg/kg TM)	97,0	101	83,0	74,0	82,0	91,0	89	103	89,0	94,0
Zn	(mg/kg TM)	72,0	66,0	64,0	70,0	71,0	76,0	82	79,0	89,0	82,0
Cu	(mg/kg TM)	23,0	17,0	20,0	18,0	20,0	19,0	21	17,0	19,0	19,0
Fe	(mg/kg TM)	217	200	207	210	202	187	168	207	197	188

A = Kontrolle, B = Mangoschale 1 %, C = Dep. Mangoschale 1 %, D = Mangoschale 2 %, E = Dep. Mangoschale 2 %

4.2.2. Ergebnisse des Tierversuchs

4.2.2.1. Gesundheitsbeurteilung

Im ersten Durchgang musste ein Küken am 7. Lebenstag (Gruppe C 3, dep. Mangoschale 1 %) vom Versuch ausgeschlossen werden (Beinfehlstellung) und am 27. Lebenstag verstarb ein Broiler (A3). Weitere gesundheitliche Besonderheiten traten bei Durchgang 1 nicht auf. Im zweiten Durchgang sind drei Tiere ausgefallen (Gruppen C4, B2, E4).

Innerhalb der zweiten Lebenswoche mussten mehrere Tiere aus dem Versuch entfernt werden, da bei der Umstellung auf die Nippeltränken Probleme aufgetreten sind (drei Tiere aus A2, 4 Tiere aus B3, 5 Tiere aus E4). Am 20. Lebenstag verstarb ein Tier der Gruppe D2, am 30. Lebenstag verstarb ein Tier der Gruppe E1 und ein weiteres Tier an Tag 32 (C3).

4.2.2.2. Leistungsdaten

Für die Untersuchung der Leistung konnten keine Unterschiede in der Entwicklung der Lebendmasse ($p = 0,926$ am 1. Lebenstag, $p = 0,209$ am 35. Lebenstag), des Körpermassenzuwachses ($p=0,206$) und der Futteraufnahme ($p = 0,891$ zwischen d 1-14 und $p = 0,232$ von d 15-35) festgestellt werden. Die Zugabe von integraler oder depektinsierter Mangoschalen führte nicht zu Unterschieden beim Futteraufwand ($p = 0,062$) über den Versuchszeitraum. Die Körpermasse im Alter von 35 d lag im Mittel bei 1655 g. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt:

Tab. 16: Einfluss der Fütterung von Mangoschalen auf die Leistung von Broilern

(Mittelwert(±Standardabweichung))

Alter in Tagen	Fütterungsgruppen					P-Wert
	A*	B*	C	D	E*	
	Lebendmasse (g/Tier)					
01 d	40,8 (±1,8)	41,4 (±1,7)	40,7 (±1,5)	40,3 (±2,4)	40,8 (±3,7)	0,926
07 d	119 (±16,7)	123 (±11,5)	121 (±13,8)	123 (±10,5)	121 (±10,6)	0,958
14 d	305 (±31,8)	309 (±23,1)	289 (±24,2)	305 (±19,4)	293 (±19,0)	0,413
21 d	618 (±60,1)	618 (±54,5)	600 (±34,0)	619 (±28,9)	596 (±43,8)	0,751
28 d	1088 (±95,1)	1065 (±116)	1080 (±88,4)	1069 (±40,1)	1037 (±52,0)	0,812
35 d	1634 (±116)	1731 (±136)	1622 (±67,6)	1643 (±66,2)	1646 (±61,6)	0,209
	Lebendmassezunahme (g/Tier)					
01 - 35 d	1593 (±114)	1690 (±136)	1581 (±66,9)	1603 (±64,2)	1606 (±60,3)	0,206
	Futtermittelverbrauch (g/Tier)					
01 - 07 d	204 (±106,4)	215 (±104)	197 (±92,1)	202 (±91,9)	217 (±113)	0,853
08 - 14 d	268 (±25,6)	259 (±38,3)	287 (±65,4)	305 (±32,3)	264 (±31,8)	0,336
15 - 21 d	515 (±76,8)	543 (±93,0)	557 (±138)	569 (±148)	510 (±66,9)	0,806
22 - 28 d	516 (±204)	573 (±259)	683 (±258)	639 (±259)	546 (±223)	0,665
29 - 35 d	1099 (±138)	1093 (±150)	1106 (±116)	1069 (±135)	1101 (±136)	0,984
01 - 14 d	472 (±99,7)	474 (±78,5)	484 (±66,4)	507 (±33,9)	481 (±84,1)	0,891
15 - 35 d	2130 (±167)	2208 (±236)	2346 (±312)	2277 (±302)	2418 (±150,6)	0,232
	Futtermittelaufwand (kg/Tier)					
01 - 14 d	1,77 (±0,21)	1,76 (±0,19)	1,95 (±0,23)	1,92 (±0,08)	1,91 (±0,33)	0,346
15 - 35 d	1,61 (±0,18)	1,56 (±0,17)	1,76 (±0,26)	1,71 (±0,26)	1,79 (±0,11)	0,196
01 - 35 d	1,64 (±0,12)	1,59 (±0,12)	1,80 (±0,23)	1,74 (±0,21)	1,84 (±0,14)	0,062
	Mortalität (in %)					
01 - 35 d	1,79 (±4,72)	2,04 (±5,40)	4,91 (±6,80)	4,91 (±6,80)	1,79 (±4,72)	0,632

n = 8, * = enthalten Daten von n = 7 Wiederholungen A = Kontrolle, B = Mangoschale 1 %, C = Dep. Mangoschale 1 %, D = Mangoschale 2 %; E = Dep. Mangoschale 2 %; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau <0,05), Daten weisen eine Normalverteilung auf

4.2.2.2. Laktatgehalte und pH-Wert in der Digesta

Die Laktatkonzentration in der Digesta zeigte nur im Rektum Unterschiede (p=0,030): die Fütterungsgruppen mit dep. Mangoschale, Mangoschale 1 % und die Kontrollgruppe zeigten gegenüber den Fütterungsgruppen mit Mangoschale und dep. Mangoschale 2 % deutlich

höhere Laktatgehalte. Im Zäkum war L-Laktat bei Gruppe B nur in einer Probe nachweisbar, daher erfolgte kein Gruppenvergleich.

Bei der statistischen Analyse der pH-Werte aller Darmabschnitte konnten keinerlei Unterschiede nachgewiesen werden. Die Fütterung der depektinisierten oder integralen Mangoschale hatte auf diesen Parameter keinen Einfluss. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 17 dargestellt:

Tab. 17: pH-Werte, L- und D-Laktat-Gehalt ($\mu\text{mol/g}$ Digesta) im Kropf und den untersuchten Digestaprobe n der fünf Fütterungsgruppen (Mittelwert (\pm Standardabweichung))

Region	Fütterungsgruppe					p-Wert
	A	B	C	D	E	
Kropf						
pH	5,30 (\pm 0,43)	5,43 (\pm 0,27)	5,20 (\pm 0,48)	5,27 (\pm 0,30)	5,26 (\pm 0,24)	0,767
L-Laktat	6,26 (\pm 8,14)	3,45 (\pm 4,20)	4,64 (\pm 7,54)	3,10 (\pm 3,69)	5,65 (\pm 6,68)	0,847
D-Laktat	2,37 (\pm 3,09)	1,27 (\pm 1,52)	1,55 (\pm 2,46)	1,25 (\pm 1,48)	1,71 (\pm 1,90)	0,852
Ileum						
pH	7,04 (\pm 0,34)	7,32 (\pm 0,33)	7,29 (\pm 0,36)	7,19 (\pm 0,44)	7,19 (\pm 0,41)	0,569
L-Laktat	0,73 (\pm 0,40)	0,49 (\pm 0,28)	0,64 (\pm 0,37)	0,66 (\pm 0,45)	1,00 (\pm 0,48)	0,170
D-Laktat	0,27 (\pm 0,13)	0,18 (\pm 0,07)	0,21 (\pm 0,12)	0,19 (\pm 0,11)	0,33 (\pm 0,29)	0,265
Zäkum						
pH	6,29 (\pm 0,59)	6,77 (\pm 0,44)	6,68 (\pm 0,40)	6,77 (\pm 0,37)	6,56 (\pm 0,57)	0,286
L-Laktat	0,18 (\pm 0,23)	0,01 (n.b.)	0,15 (\pm 0,21)	0,13 (\pm 0,17)	0,21 (\pm 0,25)	0,943
D-Laktat	0,21 (\pm 0,32)	0,03 (\pm 0,01)	0,01 (\pm 0,00)	0,04 (\pm 0,01)	0,13 (\pm 0,11)	0,478
Rektum						
pH	6,94 (\pm 0,23)	6,84 (\pm 0,29)	7,03 (\pm 0,33)	6,90 (\pm 0,44)	7,02 (\pm 0,36)	0,750
L-Laktat	2,72 (\pm 1,01)	3,65 (\pm 1,30)	3,25 (\pm 2,04)	1,71 (\pm 1,39)	1,87 (\pm 0,81)	0,064
D-Laktat	0,88 ^A (\pm 0,52)	1,0 ^A (\pm 0,42)	1,12 ^A (\pm 0,77)	0,44 ^B (\pm 0,06)	0,43 ^B (\pm 0,17)	0,030

¹Daten sind Mittelwerte von 8 Wiederholungen

²Daten sind innerhalb einer Gruppe normal verteilt, außer bei L- und D-Laktat im Kropf

A = Kontrollgruppe; B = Mangoschale 1 %; C = Dep. Mangoschale 1 %; D = Mangoschale 2 %; E = Dep. Mangoschale 2 %, n = 8 (Anzahl gültiger Fälle); p = Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzniveau <0,05; Großbuchstaben als Superskripte kennzeichnen statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den Gruppen, n.b. = nicht berechenbar

4.2.2.3. Ammoniumgehalt in der Digesta

Bei den fünf Fütterungsgruppen konnten im Ammoniumgehalt der Digesta keine Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 18).

Tab. 18: Ammoniumkonzentrationen ($\mu\text{mol/g}$) im Kropf und in den Digestaprobe der fünf Fütterungsgruppen (Mittelwert(\pm Standardabweichung))

Herkunft Digesta	Fütterungsgruppe, Anzahl										
	A	n	B	n	C	n	D	n	E	n	p-Wert
Kropf	1,36 (\pm 0,35)	7	1,43 (\pm 0,55)	8	1,11 (\pm 0,45)	8	1,09 (\pm 0,26)	7	1,01 (\pm 0,32)	6	0,253
Ileum	0,89 (\pm 0,66)	6	1,02 (\pm 0,46)	7	0,80 (\pm 0,67)	5	1,00 (\pm 0,53)	6	0,81 (\pm 0,59)	8	0,935
Zäkum	8,09 (\pm 3,48)	4	5,87 (\pm 2,34)	5	6,43 (\pm 3,16)	7	5,17 (\pm 1,58)	8	7,49 (\pm 2,81)	5	0,375
Rektum	3,98 (\pm 1,21)	4	4,93 (\pm 3,01)	8	3,98 (\pm 2,63)	6	4,35 (\pm 1,66)	6	3,51 (\pm 1,50)	7	0,798

A = Kontrollgruppe; B = Mangoschale 1 %; C = Dep. Mangoschale 1 %; D = Mangoschale 2 %; E = Dep. Mangoschale 2 %, n = Anzahl gültiger Fälle; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau $<0,05$), Daten weisen eine Normalverteilung auf

4.2.2.4. Gehalte flüchtiger Fettsäuren in der Digesta

Die Kontrollgruppe wies gegenüber den Fütterungsgruppen mit dep. Mangoschale 1 %, Mangoschale 2 % und dep. Mangoschale 2 % höhere Gehalte an Essigsäure ($p = 0,014$) im Ileum auf. Im Zäkum zeigten sich unterschiedliche Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren ($p = 0,047$), wobei die Kontrollgruppe höhere Werte als die Fütterungsgruppe mit dep. Mangoschale 2 % zeigte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt:

Tab. 19: Gehalte an flüchtigen Fettsäuren ($\mu\text{mol/g}$ frische Digesta) im Kropf und in den verschiedenen Darmabschnitten der fünf Fütterungsgruppen (Mittelwert (\pm Standardabweichung))

Organ	Substanz	Fütterungsgruppe					p-Wert
		A	B	C	D	E	
Kropf	Essigsäure	5,88 (\pm 3,99)	4,75 (\pm 1,85)	6,50 (\pm 3,67)	5,37 (\pm 2,78)	6,76 (\pm 1,82)	0,681
	Propionsäure	0,22 (\pm 0,19)	0,15 (\pm 0,15)	0,10 (\pm 0,12)	0,20 (\pm 0,15)	0,22 (\pm 0,11)	0,429
	i-Buttersäure	0,05 (\pm 0,02)	0,06 (\pm 0,01)	0,08 (\pm 0,04)	0,05 (\pm 0,03)	0,05 (\pm 0,06)	0,781
	n-Buttersäure	0,08 (\pm 0,07)	0,09 (\pm 0,05)	0,07 (\pm 0,06)	0,09 (\pm 0,07)	0,04 (\pm 0,03)	0,731
	i-Valeriansäure	0,09 (\pm 0,04)	0,06 (\pm 0,02)	0,08 (\pm 0,04)	0,09 (\pm 0,05)	0,08 (\pm 0,05)	0,645
	n-Valeriansäure	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.b.
	Gesamt SCFA ³	6,18 (\pm 4,09)	5,03 (\pm 1,89)	6,76 (\pm 3,67)	5,71 (\pm 2,86)	7,06 (\pm 1,84)	0,703
	Essigsäure	10,5 (\pm 6,26)	11,2 (\pm 3,31)	9,58 (\pm 6,44)	12,0 (\pm 8,05)	15,7 (\pm 8,46)	0,407
Ileum	Propionsäure	0,19 (\pm 0,13)	0,20 (\pm 0,13)	0,16 (\pm 0,13)	0,15 (\pm 0,12)	0,15 (\pm 0,13)	0,903
	i-Buttersäure	0,05 (\pm 0,01)	0,06 (\pm 0,05)	0,03 (\pm 0,01)	0,04 (\pm 0,01)	0,04 (\pm 0,03)	0,744
	n-Buttersäure	0,05 (\pm 0,02)	0,03 (\pm 0,02)	0,03 (\pm 0,01)	0,03 (\pm 0,02)	0,04 (\pm 0,02)	0,153
	i-Valeriansäure	0,15 (\pm 0,07)	0,12 (\pm 0,04)	0,12 (\pm 0,04)	0,15 (\pm 0,06)	0,12 (\pm 0,07)	0,590
	n-Valeriansäure	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.b.
	Gesamt SCFA ³	10,9 (\pm 6,34)	11,8 (\pm 3,54)	9,92 (\pm 6,42)	12,3 (\pm 7,90)	16,1 (\pm 8,50)	0,420
	Essigsäure	122 ^A (\pm 35,4)	90,7 ^{AB} (\pm 28,6)	79,4 ^B (\pm 10,2)	79,9 ^B (\pm 26,56)	69,0 ^B (\pm 9,83)	0,014
	Propionsäure	9,27 (\pm 3,15)	7,41 (\pm 2,78)	6,76 (\pm 3,40)	5,64 (\pm 1,56)	7,60 (\pm 4,35)	0,396
Zäkum	i-Buttersäure	1,21 (\pm 0,27)	1,35 (\pm 0,39)	0,79 (\pm 0,52)	1,00 (\pm 0,31)	0,91 (\pm 0,48)	0,141
	n-Buttersäure	14,6 (\pm 6,78)	11,3 (\pm 6,43)	13,3 (\pm 3,77)	13,1 (\pm 6,74)	12,3 (\pm 5,04)	0,927
	i-Valeriansäure	1,23 (\pm 0,38)	1,21 (\pm 0,43)	0,89 (\pm 0,53)	1,01 (\pm 0,49)	0,88 (\pm 0,51)	0,611
	n-Valeriansäure	1,73 (\pm 0,34)	1,33 (\pm 0,51)	1,32 (\pm 0,30)	1,23 (\pm 0,37)	1,29 (\pm 0,43)	0,340
	Gesamt SCFA ³	150 ^A (\pm 44,0)	113 ^{AB} (\pm 35,6)	102 ^{AB} (\pm 14,3)	102 ^{AB} (\pm 34,1)	92,0 ^B (\pm 15,9)	0,047
	Essigsäure	34,7 (\pm 26,7)	38,5 (\pm 15,7)	29,1 (\pm 16,1)	29,1 (\pm 20,1)	27,0 (\pm 14,5)	0,735
	Propionsäure	1,24 (\pm 1,11)	1,44 (\pm 1,26)	0,87 (\pm 0,59)	0,69 (\pm 0,46)	0,77 (\pm 0,56)	0,358
	i-Buttersäure	0,09 (\pm 0,06)	0,31 (\pm 0,38)	0,15 (\pm 0,09)	0,11	0,09 (\pm 0,03)	0,551
Rektum	n-Buttersäure	1,92 (\pm 2,66)	1,54 (\pm 2,20)	1,45 (\pm 2,47)	0,55 (\pm 0,66)	0,77 (\pm 1,16)	0,659
	i-Valeriansäure	0,37 (\pm 0,25)	0,38 (\pm 0,28)	0,22 (\pm 0,12)	0,39 (\pm 0,36)	0,38 (\pm 0,41)	0,760
	n-Valeriansäure	0,19 (\pm 0,21)	0,43 (\pm 0,26)	0,61 (\pm 0,64)	0,10	0,18 (\pm 0,11)	0,524
	Gesamt SCFA ³	38,1 (\pm 30,1)	42,0 (\pm 18,5)	32,0 (\pm 19,2)	30,8 (\pm 21,1)	28,9 (\pm 15,5)	0,715

¹Daten sind Mittelwerte von 8 Wiederholungen, 8 Tiere pro Käfigeinheit, Einzeltierproben

²Daten innerhalb einer Gruppe sind normal verteilt, außer für n-Buttersäure im Rektum

A = Kontrolle, B = Mangoschale 1 %, C = Dep. Mangoschale 1 %, D = Mangoschale 2 %; E = Dep. Mangoschale 2 %, Superskripte p = Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzniveau <0,05); Großbuchstaben als Superskripte kennzeichnen statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den Gruppen, n.b. = nicht berechenbar, n.n. = nicht nachweisbar, n.b. = nicht berechenbar

4.2.2.5. Quantitative Erfassung der Bakteriengruppen in der Digesta

Die quantitative Messung der fünf Bakteriengruppen mittels qPCR zeigte, dass die Fütterung von integralen oder depektinisierten Mangoschalen in verschiedenen Konzentrationen die Laktobazillen, verschiedene Clostridiengruppen oder Enterobakterien im Darmtrakt von Broilern nicht beeinflussen konnte. Verwendet wurden fünf verschiedene Gruppenprimer. Im Vergleich mit den Kontrollgruppen, welche keine integralen oder depektinisierten Mangoschalen erhalten haben, konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt (Tabelle 20).

Tab. 20: Mittlere bakterielle Zusammensetzung (log Kopien/g frischer Digesta) verschiedener Bakteriengruppen der fünf Fütterungsgruppen (Mittelwert (\pm Standardabweichung))

Fütterungsgruppe	Abschnitt	n	Laktobazillen	n	Clostridien Cluster 1	n	Clostridien Cluster 4	n	Clostridien Cluster 14a	n	Enterobakterien
A	Kropf	7	9,49 (\pm 0,62)	6	5,90 (\pm 1,06)	7	7,40 (\pm 0,93)	7	7,34 (\pm 0,70)	7	6,56 (\pm 0,92)
	Ileum	8	7,91 (\pm 0,53)	7	6,07 (\pm 0,12)	3	6,81 (\pm 0,97)	8	7,24 (\pm 1,09)	8	5,92 (\pm 0,99)
	Zäkum	8	9,44 (\pm 0,61)	8	7,67 (\pm 0,69)	8	10,6 (\pm 2,01)	7	11,5 (\pm 0,79)	8	8,78 (\pm 0,89)
B	Kropf	8	9,39 (\pm 0,36)	7	5,82 (\pm 0,61)	7	7,81 (\pm 1,14)	8	7,45 (\pm 1,28)	8	6,41 (\pm 0,81)
	Ileum	8	7,49 (\pm 0,36)	7	5,95 (\pm 0,75)	3	6,46 (\pm 0,47)	7	7,37 (\pm 1,14)	6	5,65 (\pm 0,57)
	Zäkum	8	9,37 (\pm 0,71)	8	7,73 (\pm 0,81)	8	11,1 (\pm 0,65)	8	11,4 (\pm 0,75)	8	8,89 (\pm 0,75)
C	Kropf	8	9,49 (\pm 0,40)	7	5,36 (\pm 0,45)	7	6,98 (\pm 1,00)	7	7,11 (\pm 0,70)	8	6,40 (\pm 0,65)
	Ileum	8	7,79 (\pm 0,68)	7	5,48 (\pm 1,40)	4	6,74 (\pm 1,72)	7	7,00 (\pm 0,89)	6	6,46 (\pm 1,02)
	Zäkum	8	9,62 (\pm 0,38)	8	7,93 (\pm 0,50)	8	11,0 (\pm 0,75)	8	11,7 (\pm 0,44)	8	9,28 (\pm 0,66)
D	Kropf	7	9,70 (\pm 0,39)	5	5,62 (\pm 0,43)	6	8,02 (\pm 1,19)	7	7,70 (\pm 1,21)	7	6,42 (\pm 0,92)
	Ileum	6	7,51 (\pm 0,51)	6	6,06 (\pm 0,41)	3	6,63 (\pm 1,50)	6	7,68 (\pm 1,77)	5	6,04 (\pm 1,27)
	Zäkum	8	9,06 (\pm 0,86)	8	7,18 (\pm 0,75)	8	11,5 (\pm 0,41)	8	10,8 (\pm 0,82)	8	8,65 (\pm 0,85)
E	Kropf	7	9,61 (\pm 0,39)	7	5,72 (\pm 1,31)	8	7,47 (\pm 0,71)	8	7,44 (\pm 0,72)	8	6,61 (\pm 0,70)
	Ileum	7	7,59 (\pm 0,79)	7	5,93 (\pm 0,55)	4	6,28 (\pm 0,97)	7	7,02 (\pm 0,70)	7	5,95 (\pm 1,03)
	Zäkum	7	9,30 (\pm 0,62)	7	7,96 (\pm 0,99)	7	11,4 (\pm 0,72)	7	11,4 (\pm 0,51)	7	8,75 (\pm 0,78)
p-Wert	Kropf	37	0,702	32	0,806	35	0,387	37	0,849	38	0,976
	Ileum	37	0,573	34	0,627	17	0,977	35	0,816	32	0,717
	Zäkum	39	0,548	39	0,279	39	0,446	38	0,159	39	0,561

A = Kontrollgruppe; B = Mangoschale 1 %; C = Dep. Mangoschale 1 %; D = Mangoschale 2 %; E = Dep. Mangoschale 2 %, n = Anzahl gültiger Fälle; MW = Mittelwert; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau <0,05), Daten weisen eine Normalverteilung auf

4.2.2.6. Scheinbare präzäkale Aminosäureverdaulichkeit

Die Aminosäuren Arginin ($p = 0,026$), Histidin ($p = <0,001$), Phenylalanin ($p = 0,031$), Prolin ($p = 0,003$) und Serin ($p = 0,003$) waren in der Kontrollgruppe höher als bei Zugabe der depektinisierten Mangoschale (2 %). Bei Histidin zeigte sich eine höhere Verdaulichkeit bei der Kontrollgruppe gegenüber den Fütterungsgruppen mit ein- und zweiprozentiger Zugabe der depektinisierten Mangoschalen.

Bei Prolin war die Verdaulichkeit bei Fütterung beider Konzentrationen der depektinisierten Mangoschalen sowie bei der Gruppe, die 2 % Mangoschale im Futter erhielt, niedriger im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Im Falle von Serin wiesen die Kontrollgruppe und die Gruppe mit Mangoschale 1 % höhere Verdaulichkeitswerte auf im Vergleich zur Fütterung mit depektinisierte Mangoschale 1 und 2 %. Threonin zeigte in der Kontrollgruppe ($p = 0,007$) höhere Verdaulichkeitswerte im Vergleich mit der Fütterungsgruppe mit depektinisierte Mangoschale 1 %.

Bei der Verdaulichkeit von Tyrosin ($p = 0,003$) zeigte die Fütterungsgruppe mit depektinisierte Mangoschale 1 % gegenüber der Kontrollgruppe und Mangoschale 1 % niedrigere Werte. Die Fütterungsgruppe mit Mangoschale 1 % wies gegenüber den Fütterungsgruppen mit depektinisierte Mangoschale 2 % eine signifikant höhere scheinbare Verdaulichkeit auf (siehe Tabelle 21).

Tab. 21: Einfluss der Supplementierung von Mangoschalen auf die präzäkale scheinbare Verdaulichkeit von Aminosäuren^{1,2}

Inhaltsstoffe	Fütterungsgruppe					P-Wert
	A	B	C	D	E	
Trockenmasse	1,60 (±0,37)	1,54 (±0,30)	1,53 (±0,46)	1,63 (±0,32)	1,41 (±0,41)	0,713
Rohprotein	86,5 (±2,48)	86,2 (±1,44)	85,6 (±4,18)	85,2 (±3,96)	83,8 (±2,32)	0,171
Alanin	90,3 (±2,32)	89,5 (±1,87)	87,4(±4,05)	88,4 (±3,08)	87,6 (±2,47)	0,115
Arginin	94,3 (±0,73) ^A	92,9 (±1,33) ^{AB}	92,3(±2,47) ^{AB}	92,8(±1,66) ^{AB}	91,8(±1,54) ^B	0,026
Asparaginsäure	89,0 (±1,42)	87,6 (±2,15)	85,4(±4,45)	87,2 (±3,63)	85,4 (±2,40)	0,030
Cystein	78,0 (±14,11)	77,3 (±9,32)	79,4 (±9,90)	72,6 (±9,09)	79,6 (±11,2)	0,914
Glutaminsäure	90,9 (±1,44)	88,7 (±1,90)	89,3 (±3,20)	88,1 (±3,01)	89,1 (±1,80)	0,329
Glycin	86,0 (±2,13)	84,6 (±2,84)	82,8 (±4,83)	83,5 (±4,88)	82,8 (±2,81)	0,185
Histidin	93,1 (±1,16) ^A	90,9 (±1,62) ^{AB}	87,8 (±3,90) ^B	89,5 (±2,20) ^{AB}	87,8 (±2,36) ^B	0,000
Isoleucin	89,3 (±1,98)	87,3 (±2,31)	87,8 (±4,29)	87,5 (±3,28)	87,7 (±2,61)	0,626
Leucin	91,1 (±1,48)	89,4 (±1,87)	88,3 (±3,53)	88,4 (±2,95)	88,2 (±2,24)	0,100
Lysin	83,8 (±2,27)	81,9 (±2,87)	80,2 (±6,85)	81,8 (±6,37)	80,0 (±5,21)	0,339
Methionin	95,4 (±2,56)	94,5 (±2,15)	95,0 (±2,61)	93,5 (±1,86)	95,0 (±2,96)	0,829
Phenylalanin	92,0 (±1,19) ^A	90,5 (±1,57) ^{AB}	89,1 (±3,38) ^{AB}	90,1 (±2,36) ^{AB}	88,9 (±2,12) ^B	0,031
Prolin	89,3 (±1,90) ^A	85,7 (±2,72) ^{AB}	84,6 (±4,29) ^B	82,7 (±4,39) ^B	83,4 (±2,65) ^B	0,003
Serin	89,7 (±1,40) ^A	88,9 (±1,99) ^{AB}	85,2 (±4,45) ^C	87,53 (±3,72) ^{ABC}	85,7 (±2,30) ^C	0,003
Threonin	86,7 (±2,20) ^A	85,7 (±2,70) ^{AB}	81,6 (±5,48) ^B	84,7 (±4,46) ^{AB}	82,5 (±2,89) ^{AB}	0,007
Tyrosin	90,8 (±2,39) ^{AB}	91,6 (±2,06) ^A	85,1 (±4,85) ^C	86,7 (±5,68) ^{ABC}	85,7 (±4,11) ^{BC}	0,003
Valin	87,7 (±2,28)	85,0 (±2,83)	85,3 (±4,96)	85,0 (±4,06)	84,8 (±3,02)	0,375

A = Kontrolle, B = Mangoschale 1 %, C = Depektinierter Mangoschale 1 %, D = Mangoschale 2 %; E = Depektinierter Mangoschale 2 %; ¹Daten sind Mittelwerte von 9 Wiederholungen pro Fütterungsgruppe; ²Daten innerhalb einer Gruppe weisen eine Normalverteilung auf, p = Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzniveau <0,05); Großbuchstaben als Superskripte kennzeichnen statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den Gruppen

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung einer präbiotischen Wirkung mittels semi-kontinuierlichen Fermentationssystems

Diskussion der Methode

Das semi-kontinuierliche Fermentationssystem sollte dazu dienen, Rückschlüsse auf die Verdaubarkeit der Testsubstanzen aus Mango und Apfel durch Zäkumbakterien von Broilern über die Messung bakterieller Metaboliten zu ziehen.

Auswahl Inokulum

Die bakterielle Zusammensetzung der Mikrobiota im Darm unterliegt physiologisch altersabhängigen Schwankungen (Ranjitkar et al. 2016). Die Darmflora ist ab einem Alter zwischen 28-29 Tagen bei Broilern weitgehend differenziert und entwickelt (Lu et al. 2003, Ranjitkar et al. 2016). Für die eigenen Untersuchungen wurde Zäkuminhalt von jeweils drei 35 d alten Broilern verwendet, die mit einem Kontrollfutter ohne besondere Zusätze gefüttert worden waren. Der Versuch wurde insgesamt 3-mal an unterschiedlichen Tagen wiederholt, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Darmflora altersspezifisch stabil ausgeprägt war und tagesspezifische Einflüsse durch die Anzahl der Wiederholungen ausgeglichen werden konnten. Die Gewinnung des Zäkuminhalts wurde unmittelbar nach Eröffnung der Bauchhöhle in ein steriles Gefäß vorgenommen und mit der notwendigen Menge eines anaeroben Puffers gemischt, wie es auch in der Literatur bereits beschrieben wurde (Meimandipour et al. 2009). Als Nachweis für anaerobe Reaktionsbedingungen wurde dem Puffermedium Resazurin als Farbindikator hinzugefügt. Ein Farbumschlag als Nachweis für ein aerobes Milieu fand nicht statt, weshalb davon auszugehen war, dass anaerobe Versuchsbedingungen während der Inkubation herrschten.

Voruntersuchungen hatten ergeben, dass eine Suspension mit 10 % Digesta in der Ausgangslösung und 1 % im Versuchsröhrchen geeignet war, um wiederholbare Ergebnisse zu erhalten. Dabei ist zu bedenken, dass im Zäkuminhalt noch Substrate aus der Digesta vorhanden waren, die die Versuchsergebnisse beeinflusst haben können. Dieser Gehalt ist aber durch die beschriebene Erstellung einer Sammelprobe als vergleichbar zwischen allen Probenansätzen zu betrachten.

Auswahl Testsubstanz

Die Mangoschale enthält eine Mischung aus Polyphenolen, einen hohen Anteil an Pektin und einen geringen Anteil an Protein. Bei dem eingesetzten Apfelpektin, dem Mangopektin und den Polyphenolen handelt es sich um extrahierte Fraktionen aus den Naturprodukten, die chemischen Einflüssen durch das Extraktionsverfahren ausgesetzt waren. Das Apfelpektin ist eingeschränkt mit dem Pektin aus der Mango vergleichbar, da es sich zwar auch um ein hochverestertes Pektin handelt, jedoch bei der Herstellung des Apfelpek­tins die Polyphenolrückstände des Apfels als Einflussfaktor entfernt werden. Aufgrund der hohen Viskosität durch die enthaltenen Pektine limitierte sich der Einsatz aller Substanzen auf einen Gehalt von 2 % in der Stammlösung und 0,2 % im Probenansatz. Zusätzlich war es notwendig, eine Behandlung im Ultraschallbad durchzuführen, um eine homogene Verteilung in der Lösung sicherzustellen.

Als Negativkontrollen wurden Probenansätze ohne Zugabe von Zäkuminhalt für alle Substanzen hergestellt und deren Werte von den Ergebnissen der mit Zäkuminhalt beimpften Proben als Leerwert abgezogen. Bei der Auswahl der Testsubstanzen muss beachtet werden, dass die Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf ein in-vivo-Modell übertragbar sind: Apfelpektin und Mangopektin stehen im Zäkum als im Dünndarm unverdauliche Nicht-Stärke-Polysaccharide den Bakterien zur Verfügung, welches für Glukose und auch die Polyphenole ausgeschlossen werden kann. Glukose (Awad et al. 2008) und Polyphenole (Brenes et al. 2008) werden zum größten Teil bereits vom Dünndarm absorbiert, während die hinteren Darmabschnitte hierfür eine untergeordnete Rolle spielen.

Wahl der Technik

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation für 24h mit Zäkuminhalt von Broilern dazu geeignet ist, Fermentationsprofile zur Testung unterschiedlicher Zusätze zu erstellen und daraus Rückschlüsse auf die Fermentierbarkeit in-vivo zu ziehen (Barnes und Impey 1970, Meimandipour et al. 2009).

Bei der gewählten Temperatur während der Inkubation ist zu beachten, dass physiologisch im Zäkum bei Vögeln Temperaturen von 41 °C (Dawson und Whittow 2000) vorherrschen und die gewählte Temperatur von 38 °C darunter lag. In vergleichbaren Fermentations- und Infektionsstudien mittels In-vitro-Kulturen mit Zäkuminhalt als Inokulum wurden in der Literatur verschiedene Temperaturen zur Inkubation verwendet. So hat eine Studie gezeigt, dass bei 37 °C eine In-vitro-Inkubation dazu geeignet ist, reproduzierbare Ergebnisse zum bakteriellen Metabolismus zu erhalten (Rubinelli et al. 2016), während in anderen Studien mit Temperaturen um 41 °C gearbeitet wurde (Meimandipour et al. 2009).

Die Proben wurden in kleinen Portionen für die verschiedenen Messungen eingefroren, um hierbei eine negative Beeinflussung der Proben durch einen wiederholten Auftauvorgang zu vermeiden. Dieses Vorgehen ermöglichte es, im Nachhinein einmalig eine Probe aufzutauen, diese aufzuarbeiten und zu messen. Die Einflüsse durch wiederholten Kontakt zu Sauerstoff, beispielsweise auf die flüchtigen Substanzen, konnten so auf ein Minimum begrenzt werden. Dennoch war Luftkontakt gegeben und eine Beeinflussung kann somit nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Um den Gehalt an Ammonium und flüchtigen Fettsäuren zu messen, wurden die einzeln abgefüllten Proben in einem Eisbad aufgetaut und die Messung durchgeführt.

Diskussion der Ergebnisse

Als Nachweis für die Stoffwechselaktivität produzieren die in der Digesta enthaltenen Bakterien Stoffwechselprodukte wie flüchtige Fettsäuren, Milchsäure und Ammonium und beeinflussen hiermit den pH-Wert. Der pH-Wert der Ansätze wurde durch die ausgewählten Substanzen beeinflusst. Das in den Untersuchungen eingesetzte Medium (PRAS) zeigte nach der Inkubation einen pH-Wert von 6,70. Alle Ansätze mit Substratzugaben, bis auf die Polyphenole, bewegen sich nahe diesem Bereich. Die gelösten Polyphenole hingegen zeigten einen pH-Wert von 2,85, welcher jedoch zu keiner erhöhten Absenkung des pH-Wertes in Verbindung mit den anderen Lösungen bei den Proben ohne Inokulum führte.

Ein Grund für die festgestellte verminderte Absenkung des pH-Wertes in den Fermentationsansätzen mit Zugabe der Testsubstanzen gegenüber der Positivkontrolle Glukose dürfte in deren molekularen Aufbau liegen. Die vielfachen Verzweigungen und Anheftungen von Methylresten am Grundgerüst des Pektins aus Mango und Apfel führten zu einer Verzögerung der Verwertung durch die Darmbakterien und somit zu einer geringeren Produktion von bakteriellen Stoffwechselprodukten. Dieses Ergebnis wurde auch in einer Studie mit Fütterung von hoch und niedrig methyliertem Zitruspektin bei Legehennen bestätigt (Langhout et al. 1999). Die Ansätze mit Mangoschale unterschieden sich hinsichtlich des pH-Werts nicht von den Ansätzen mit Polyphenolen, vermutlich, weil die Gehalte an Polyphenolen in der Mangoschale sehr hoch sind (Ajila und Prasada Rao 2013). Somit ist davon auszugehen, dass beide Substrate vergleichbare antimikrobielle Effekte haben (Kabuki et al. 2000a). Apfelpektin zeigte erwartungsgemäß die geringste pH-Absenkung in den Inkubationsansätzen, da es sich um ein hochmethyliertes Pektin handelte. Die Bakterien müssen sich an die Verwertung von verzweigt-kettigen Methylresten erst adaptieren, was Zeit beansprucht, welche am Ende der 24h fehlte, um die niedrigen pH-Werte der anderen Substanzen zu erreichen.

Ammonium gilt als Stoffwechselprodukt der im Zäkum lebenden Bakterien und kann einen Hinweis auf mikrobielle Proteolyseprozesse geben. Ammonium kann zu einer Schädigung der Enterozyten führen und wird daher als toxisches Stoffwechselprodukt angesehen (Macfarlane und Macfarlane 1995). Betrachtet man die Abfolge der einzelnen Substanzen in den Fermentationsansätzen, so zeigte Apfelpektin gefolgt von Mangoschale und Polyphenolen die höchste Produktion von Ammonium. Vom Apfelpektin unterscheiden sich Mangopektin und Glukose. Der Gehalt an Ammonium lag hier nur halb so hoch wie beim Apfelpektin. In den Pektinen ist nur in geringem Umfang Eiweiß enthalten, der Hersteller des verwendeten Apfelpektins gab einen Reststickstoffgehalt von 1 - 2,5 % an. Das Ergebnis, dass Mangopektin im Vergleich mit Apfelpektin signifikant niedrigere Ammoniumgehalte in den Inkubationsansätzen induzierte, die sich von den Werten von Glukose nicht signifikant unterschieden, lässt darauf schließen, dass der Reststickstoffgehalt von bis zu 2,5 % im Apfelpektin in Kombination mit dem Restgehalt an nicht verwertbarem Protein im Zäkuminhalt hier zu höheren Werten als beim im Labormaßstab hergestellten Mangopektin geführt hatte. Es ist davon auszugehen, dass sich das Mangopektin durch seinen molekular ähnlichen Aufbau zum Apfelpektin auch wie dieses hätte verhalten müssen. Bei Mangopektin konnte zusätzlich eine zu hohe Standardabweichung bei der Messung beobachtet werden, was eine Beeinflussung der Messwerte nicht ausschließen lässt. Den zweithöchsten Ammoniumgehalt der getesteten Substanzen zeigte die Mangoschale, was möglicherweise auf den Proteinanteil zurückzuführen ist (Fasoli und Righetti 2013). Die in den Hungateröhrchen mit Zusatz von Glukose festgestellten Ammoniumgehalte sind möglicherweise auf im Inokulum enthaltene Substrate zurückzuführen, was sich auch durch den Vergleich mit einer Probe mit Zäkuminhalt aber ohne Testsubstanz abzeichnet.

Die statistischen Auswertungen der Messergebnisse der flüchtigen Fettsäuren haben gezeigt, dass bei Essigsäure und n-Buttersäure teilweise sehr deutliche Veränderungen des Fettsäuremusters gegenüber den mit Glukose inkubierten Ansätzen nachgewiesen werden konnten. Da die Produktion der flüchtigen Fettsäuren auf der Verwertung von Kohlenhydraten beruht, war zu erwarten, dass Glukose als leicht fermentierbarer Einfachzucker die höchste Produktion verursacht. Dabei ist bei der Übertragung auf Reaktionen in-vivo zu bedenken, dass Glukose bereits in den vorderen Darmabschnitten weit vor dem Zäkum absorbiert wird. Erwartungsgemäß zeigen Mangoschale und Polyphenole, die den niedrigsten Kohlenhydratanteil im Vergleich mit den Pektinen aufweisen, die geringste Produktion von kurzkettigen Fettsäuren. In-vivo konnte bei Hühnern nachgewiesen werden, dass durch Pektin im Futter eine Steigerung der Produktion flüchtiger Fettsäuren beobachtet werden kann, insbesondere im Zäkum (Romruen et al. 1988).

Bei der Essigsäure fiel die deutliche Erhöhung bei Zugabe des Apfelpektins gegenüber den eingesetzten Mango-Polyphenolen auf. Ein Grund dafür könnte sein, dass neben unterschiedlicher Substratverfügbarkeit, die in der Mangoschale enthaltenen Polyphenole in-vitro eine antibakterielle Wirkung zeigen (Kabuki et al. 2000a) und keine Kohlenhydratquelle darstellen.

Bei der Essigsäure hat die Zugabe von Mangopektin gegenüber der Kontrollsubstanz Glukose numerisch höhere, jedoch nicht signifikante Werte in den Inkubationsansätzen erreicht. Durch die hohe Standardabweichung haben sich diese aber nicht gegenüber den Ansätzen mit Glukose oder Apfelpektin absichern lassen. Beide eingesetzten Pektinsorten stehen im Gegensatz zu Glukose im Zäkum für die Mikroorganismen zur Verfügung, was eine Wirkung auf die Darmbakterien in diesem Abschnitt wahrscheinlich erscheinen lässt.

Bei der n-Buttersäure erzeugten die eingesetzten Testsubstanzen ebenfalls einen signifikant niedrigeren Gehalt im Vergleich zur Kontrollsubstanz Glukose. Dieses Ergebnis wurde bei in-vivo-Studien an Broilern bestätigt, in denen hochmethyliertes Pektin aus Zitrusfrüchten einen vergleichbaren Effekt zeigte. Das Zitruspektin ist den hier getesteten Pektinen aus Mango und Apfel vergleichbar, da es ebenfalls einen relativ hohen Gehalt an hochmethylierten Verbindungen aufweist. Bei der Fütterung von 3 % hochmethyliertem Pektin an Broilern konnte eine Absenkung des Gesamtgehalts an flüchtigen Fettsäuren im Zäkum gezeigt werden (Langhout und Schutte 1996). Diese Absenkung wurde auf eine Reduktion von Propionsäure, Buttersäure und Valeriansäure zurückgeführt, was auf eine verminderte Bakterientätigkeit durch das enthaltene Pektin abhängig vom Methylierungsgrad und Herkunft des Pektins zurückgeführt wurde. Die Veränderungen hinsichtlich des Gehalts flüchtiger Fettsäuren traten im Dünndarm und im Zäkum auf, abhängig vom Methylierungsgrad.

Zu der Frage der grundsätzlichen Übertragbarkeit von In-vitro-Untersuchungen auf die Verhältnisse im Tier ist zu bedenken, dass in-vitro die in Därmen ablaufenden komplexen Prozesse nur sehr eingeschränkt simuliert werden können. So ist zum Beispiel bei den Produkten mit Polyphenolen nicht nur deren Resorption über die Darmwand, sondern auch die Interaktion durch andere Inhaltsstoffe wie Zucker und Fettgehalt zu bedenken (Ortega et al. 2009). Ob Polyphenole im Zäkum in-vivo beim Broiler vorhanden sind oder bereits im Dünndarm absorbiert werden, müsste für die einzelnen Polyphenolfractionen geprüft werden, da hier Unterschiede bezogen auf die verschiedenen Fraktionen zu vermuten sind. Es konnte im Rahmen von in-vivo-Studien gezeigt werden, dass Polyphenole aus Kakao, die partiell denen der Mango ähnlich sind, im vorderen Verdauungstrakt resorbiert werden können und im Plasma nachweisbar sind (Spencer et al. 2001, Holt et al. 2002, Ortega et al. 2009).

Bei Berücksichtigung dieser grundlegenden biologischen Tatsachen kann aus den vorliegenden Untersuchungen zu mindestens geschlossen werden, dass die untersuchten Substanzen aus Mango und Apfel fähig sind, den Metabolismus der im Inokulum enthaltenen Bakterien zu modifizieren. Ob dieses auch unter in-vivo-Bedingungen relevant ist, hängt von der Natur der Stoffe, aber auch von begleitenden Futterinhaltsstoffen sowie der Dosierung über das Futter ab.

5.2. Charakterisierung von Adhäsionseffekten pflanzlicher Extrakte auf ausgewählte aviäre *E. coli*

Diskussion der Methode

Bei dem Adhäsionsversuch mit ausgewählten aviären *E. coli* sollte die These überprüft werden, ob Substanzen aus der Mango im Vergleich zu Apfelpektin und Glukose fähig sind, eine Bindung der Bakterien herbeizuführen und so das Darmepithel vor einer Adhäsion durch diese Bakterien zu schützen und diese ohne Infektion in-vivo auszuschleiden. Dieser Abschnitt ist gegliedert mit einer Diskussion an den ausgewählten Bakterienstämmen, an den Testsubstanzen und an der Methode an sich sowie einer Diskussion der Ergebnisse.

Auswahl der Bakterienstämme

Bei den ausgewählten Bakterienkulturen handelte es sich um enteropathogene *E. coli*, die aus Broilern der Legehennenhaltungen und der Kükenaufzucht stammten. Informationen über die genutzten Stämme, außer dass es sich um APEC handelt, sind kaum verfügbar gewesen. Bei dem Stamm IMT 11863 ist bekannt, dass er aus Broilern isoliert wurde. Eine Studie aus Ägypten konnte eine Vielzahl an unterschiedlichen Serovaren von *E. coli* aus erkrankten und gesunden Tierbeständen ziehen, hierbei wurden Kulturen von Organen aus 276 erkrankten und Kloakentupfer von 27 als gesund betrachteten Broilern gesammelt und kultiviert. Die Studie ergab, dass das Serovar O78 zusammen mit einem weiteren Serovar bei 60 % der kranken Tiere vorkam (Mohamed et al. 2014). Bei den eingesetzten Stämmen IMT 2271 und IMT 2358 handelte es sich um zwei Varianten dieses Serotyps. Für die verbliebenen Stämme waren Informationen über deren Zugehörigkeit zu einem Serovar nicht verfügbar, jedoch ihr Ursprung. Es wurden Serovare bei dem Versuch gewählt, die aus verschiedenen Organen stammten. So handelte es sich bei dem Kommensalen IMT 15146 um eine Reinkultur, die aus einem Kloakentupfer eines gesunden Tieres gewonnen wurde, bei IMT 2271 handelte es sich um ein Isolat mit den Serogruppen O1, O2 und O78, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass es sich um eine Mischinfektion des Tieres gehandelt haben könnte, aus dessen Leber dieses Isolat gewonnen wurde. Da die ausgewählten Stämme von *E. coli* bei dem Adhäsionsversuch möglichst nahe an realen Bedingungen im Stall liegen sollten, wurde bewusst ein Isolat aus einer realen Mischinfektion gewählt. Bei den anderen pathogenen

Isolaten handelte es sich bei IMT 9241 um ein Isolat von einem un spezifizierten Tupfer, bei IMT 2358 um ein Isolat aus der Leber und bei IMT 11863 um ein Keimisolat unbekannter Herkunft der *E. coli*. Die Identifizierung verschiedener Virulenzmerkmale wurde nur für den Stamm IMT 2358 durchgeführt, es handelte sich hierbei um die Virulenzmerkmale astA -, FyuA +, irp2 +, aer +, tsh +, fimC +, papC +, hlyE -, stx2f -. Die Studie aus Ägypten konnte auch zeigen, dass es sich bei tsh und papC um häufige Virulenzmerkmale bei sowohl pathogener und apathogener *E. coli* handelt (Mohamed et al. 2014). Bei einer weiteren Studie konnte zuvor anhand der Isolate aus deutschen Ställen gezeigt werden, dass das Vorkommen der Virulenzmerkmale irp2, tsh und fimC sowohl bei verschiedenen pathogenen und apathogenen Typen auftritt, als auch eine Zuordnung zu einem bestimmten Serotyp aufgrund des horizontalen Gentransfers nicht fest vornehmbar ist und die Kombination verschiedenster Virulenzfaktoren mannigfaltig ist (Ewers et al. 2004). Die verwendeten *E. coli* in dem Adhäsionsversuch stellten, trotz ihrer breiten Herkunft aus verschiedensten Ställen, nur eine kleine Auswahl für die Bakterienspezies dar. Es wäre wünschenswert gewesen, vollständige Informationen über die Serovare und die Virulenzmerkmale für die Aussagekraft und Übertragbarkeit zu haben. In diesem Versuch sollte die These überprüft werden, ob es durch die Substanzen möglich ist, eine Adhäsion in-vitro an die pflanzlichen Substanzen aus der Mango hervorzurufen. Dies konnte für alle eingesetzten *E. coli* -Stämme und Substanzen bestätigt werden. Dass nur eine Signifikanz bei dem Stamm IMT 11863 auftrat, zeigt, dass kleinste Unterschiede zwischen den Stämmen in-vitro vorlagen und alle Stämme an allen Substanzen adhäreren konnten. Die Reaktionen anderer Stämme als der verwendeten könnte demnach auch anders ausfallen und die Übertragbarkeit ist daher nicht zwingend gegeben und war auch nicht Teil der Untersuchung. Mit den ausgewählten Stämmen kann die These, dass enteropathogene *E. coli* an den Substanzen aus Mango und Apfel adhäreren können, bestätigt werden, insbesondere der Stamm IMT 11863 zeigte ein besonders schnelles Wachstum auf Apfelpektin.

Auswahl der Substanzen

Die ausgewählten Testsubstanzen Mangoschale, Mangopolyphenole, Mangopektin und Apfelpektin sowie Glukose waren identisch mit den Substanzen aus dem semi-kontinuierlichen Inkubationssystem, was eine tiefer gehende Analyse möglicher Effekte auf Bakterien im Darm von Broilern zum Anlass hatte. Pektine aus Mango und Apfel zählen, wie bereits aufgezeigt, zu den hochveresterten Strukturen, an deren Methylverbindungen verschiedene Kohlenhydrate geknüpft sind (May 1990, Berardini et al. 2005). Die Pektine sind sehr schwer in Lösung zu bringen und bilden unabhängig von der Beschaffenheit des Untergrunds schnell visköse Beläge, was industriell genutzt wird (May 1990). Eine homogene Verteilung ist daher nur bedingt zu gewährleisten und es wurde wie bei der semi-kontinuierlichen

Kurzzeitinkubation eine Verdünnung auf 2 % in der Stammlösung gewählt. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Pektine aus Orangenschalen fähig sind, HT-29 Zellen, die im Darm von Menschen vorkommen, vor einer Infektion durch *E. coli* zu schützen. Hierbei wurde der Stamm O157:H7 eingesetzt und die Zellzahl der vermehrten *E. coli* konnte um $1,2\% \pm 3.2$ gegenüber der Kontrolle gesenkt werden, wobei der Effekt bei *Vibrio cholerae*, dem Erreger der Cholera, sogar auf 83,9 % anstieg. Die Autorin sah in den Pektinen wie auch in anderen Kohlenhydraten das Potenzial als vielversprechende Substanzen in der Anti-Adhäsionstherapie, insbesondere da der Effekt konzentrationsabhängig war. Eine geringe Konzentration von 2.5 % in der Lösung reichte bereits aus, um diese Effekte hervorzurufen, wohingegen 0,5 % geringere Effekte zeigte (Wang et al. 2015). Polyphenole der Mango, insbesondere Mangiferin zeigten nachweislich antibakterielle Effekte in-vitro bei einer Konzentration von 7,5 % gegenüber *E. coli* (Stoilova et al. 2005). In einer weiteren Studie wurde ein polyphenolischer Extrakt aus der Rinde des Mangobaums verwendet, um das Ausmaß antibakterieller Effekte zu ermitteln und mit gängigen Antibiotika zu vergleichen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 20 % zu einem Hemmkreis von 12 mm führte, wohingegen Streptomycin (1mg/ml) und Ampicillin (10 µg/ml) zu keiner Hemmung fähig waren. Dieser Effekt wurde auf die enthaltenen Alkaloide, Saponine und Tannine zurückgeführt (Akinpelu und Onakoya 2006). Polyphenole sind in allen Teilen der Pflanze nachweisbar (Saleh und El-Ansari 1975), so auch in der Fruchtschale, weshalb zu erwarten gewesen wäre, dass eine Hemmung des Wachstums von den eingesetzten *E. coli* -Stämmen bei den Substanzen Mangoschale und Mangopolyphenole beobachtbar wäre. Jedoch war dies nicht der Fall. Möglicherweise liegt das an der geringen Konzentration, da die genannten Studien höhere Konzentrationen eingesetzt haben, was jedoch aufgrund der Vergleichbarkeit mit den eingesetzten Pektinen im Adhäsionsversuch nicht möglich war. Zusätzlich konnten bei höheren Konzentrationen hochmethylierten Pektins in der Ernährung von Broilern bereits negative Einflüsse auf die Leistung beobachtet werden (Langhout et al. 1999), weshalb höhere Konzentrationen eine Übertragung auf Zustände in-vivo aufgrund der dort auftretenden Viskositätserhöhung der Digesta als unrealistisch betrachtet wurden. Glukose diente auch hier als leicht zu verstoffwechelndes Substrat als Positivkontrolle für die eingesetzten *E. coli*, da in Studien gezeigt werden konnte, dass *E. coli* die für die Adhäsion notwendigen Enterotoxine vermehrt produziert (Wijemanne und Moxley 2014), wenn Glukose als Nahrung vorlag und so die gewonnene Energie in bakterielles Wachstum umgesetzt werden konnte (Don 2008). Die ausgewählten Substanzen stellten aufgrund ihrer Löslichkeitsverhalten in der gewählten Konzentration als auch aufgrund ihrer erwarteten Interaktion mit *E. coli* eine gute Auswahl zur Ermittlung anti-adhäsiver Fähigkeiten in diesem Modell dar und erlauben eine tiefer gehende Analyse der Effekte aus dem ersten In-vitro-Versuch.

Wahl der Methode

Das Adhäsionsmodell wurde gewählt, um weitergehende Effekte bezüglich der Eignung von Pektinen und polyphenolhaltigen Substanzen aus der Mango gegenüber bestimmter aviär pathogener *E. coli* zu ermitteln. Die Methode erfolgte in Anlehnung an eine Studie zur Evaluierung bakterieller Adhäsion und dem damit verbundenen Wachstumsparametern (Becker et al. 2007). Die Methode war bereits im Institut etabliert und es besteht eine Veröffentlichung (Gaertner 2011). Wie bei der Studie von Gaertner (2011) wurden durch die Messung der Extinktion nach der Beschichtung und Infektion der Platten mit verschiedenen Stämmen von *E. coli* sigmoidale Wachstumskurven zur Ermittlung des Verlaufs und der Dauer erstellt. Hierbei zeigte sich, dass das Wachstum nach ungefähr fünf Stunden messbar und nach 10 h abgeschlossen war, weshalb dieser Messzeitraum für die weiteren Analysen genutzt wurde. Zur Durchführung des Versuchs war es zunächst notwendig, die unterschiedlichen Bakterienstämme anzuzüchten. Hierbei waren unterschiedliche Temperaturen als mögliche Einflussfaktoren vorhanden. Die Bakterienkulturen hatten bei Entnahme aus dem Inkubator eine optimale Anzuchttemperatur von 37 °C laut den Anzuchtbedingungen der gewählten Stämme. Sie wurden zentrifugiert, gewaschen und ausgezählt. Dieser Vorgang wurde durchgeführt bei einer standardisierten Labortemperatur von 20 °C ohne weiteres Zuführen von Wärme und die eingesetzten Flüssigkeiten wiesen ebenfalls Raumtemperatur auf. Durch die kurzzeitig absinkenden Temperaturen wurde die Geschwindigkeit des Stoffwechsels der Enzyme beeinflusst (Don 2008), was sich durch eine scheinbare Anlaufzeit von fünf Stunden im beheizten Plattenleser bemerkbar gemacht haben könnte. Wenn man diese Waschungs- und Verdünnungsschritte mit ebenfalls 37 °C warmen Flüssigkeiten durchführen würde, ist es wahrscheinlich, dass die scheinbare Anlaufzeit bis zu einem sichtbaren Wachstum schneller gewesen wäre. Da der Versuch jedoch bereits in dieser Abfolge erfolgreich am Institut mit *E. coli* vom Schwein durchgeführt wurde (Gaertner 2011), wurde die gewählte Vorgehensweise beibehalten, um belastbare Ergebnisse ohne neue Einflussfaktoren zu erhalten. Allerdings haben Hühner und Broiler in-vivo eine höhere Körpertemperatur als Säugetiere. Diese liegt zwischen 39-42 °C (Dawson und Whittow 2000). Da die Bebrütungstemperatur der infizierten Platten und des Inkubators vorab auf 36-38 °C eingestellt war und die Anzucht bei 37 °C durchgeführt wurde, waren die verwendeten *E. coli* an die etwas niedrigere Temperatur angepasst. Die Adaption an 37 °C erfolgte vorab bei der Kultivierung der *E. coli* über mehrere Passagierungen. Die Temperatur hat Einfluss auf den Ablauf des Stoffwechsels der Bakterien und spielt auch eine Rolle in der Aktivierung von Gensequenzen zur Infektion und ist über mehrere Passagierungen nachweislich adaptierbar (Rudolph et al. 2010). Für eine Übertragung der Ergebnisse auf Vorgänge in-vivo ist dieses Modell daher nur bedingt

geeignet. Hinzu kamen weitere mögliche Einflussfaktoren des Versuchsablaufs, die mit der Herstellung der Substanzlösungen zusammenhingen. Die Volumenzunahme durch das Aufquellen des Pektins bei Kontakt mit Flüssigkeiten stellte im Zusammenhang mit der Sterilfiltration eine Problematik dar, da die Filter sehr schnell verlegt wurden und ausgewechselt werden mussten. Bei der Glukose und den Polyphenolen war eine Lösung in wässrigen Substanzen hingegen vergleichbar einfach gewesen. Die Mangoschale stellte ein Mittelmaß zwischen den eingesetzten Substanzen dar. Es ist fraglich, wie viel Pektine von Mango oder Apfel in der eingesetzten Substanzlösung noch vorhanden waren und ob dieses Modell für Pektine geeignet ist. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob durch die vielfältigen Spülvorgänge die eingesetzten Pektine durch die Bildung eines viskösen Bodensatzes in den beschichteten Vertiefungen gegenüber den anderen Substanzen einen Vorteil hatten. Diesen Belag konnte man hier makroskopisch leicht erkennen. Dies war bei den anderen Substanzen nicht der Fall. Eine Beendigung der Bindungsreaktionen und die Verhinderung möglicher Adhäsion an die mikroskopischen Strukturen der beschichteten Platten wurde durch das bovine Serum Albumin herbeigeführt. Eine Studie hat gezeigt, dass Albumin als Stoppreagenz besonders geeignet ist, da es auf Zellebene keine Bindungsstellen für bakterielle Fimbrien bietet (Sokurenko et al. 1995) und daher weitere Reaktionen der Bakterien mit der Polystyrolstruktur der Platte nahezu ausgeschlossen werden können. Ein geringes Restrisiko für die Bindung von Albumin an die pflanzlichen Substanzen besteht dennoch und konnte nicht ausgeschlossen werden. Da für jede Substanz die gleiche Fläche für eine Negativkontrolle ohne Beimpfung mit *E. coli* zur Verfügung stand und hier keine Zunahme der Extinktion stattgefunden hatte, kann davon ausgegangen werden, dass eine Kontamination für andere als die behandelte Vertiefung ausgeschlossen werden konnte. Da dieses Modell auf der Messung eines unterschiedlichen Wachstumsverhaltens verschiedener Bakterienstämme auf zuvor mit pflanzlichem Materialien beschichteten Platten beruht, um Hinweise auf die Eignung der Substanzen in-vivo zu geben, was es auch erfüllte, konnte die gewählte Methode für die Fragestellung als geeignet betrachtet werden.

Diskussion der Ergebnisse

Statistisch konnte ein Einfluss der Substanzen auf *E. coli* ausschließlich bei dem eingesetzten Stamm IMT 11863 bei Apfelpektin nachgewiesen werden. Apfelpektin zeigte eine hochsignifikante höhere Vermehrung der *E. coli* gegenüber der Positivkontrolle mit dem Wachstumsmedium BHI und allen anderen Substanzen. Wenn man dieses Ergebnis auf den lebenden Organismus überträgt, bedeutet dies, dass Apfelpektin potenziell für den *E. coli* Stamm IMT 11863 ein gegenüber der Darmwand attraktiveren Nährboden darstellt und so für eine schnellere Ausscheidung und verminderte Infektion durch die verminderte Adhäsion an den Wirtszellen sorgen könnte. Dass diese Effekte bei den anderen Stämmen nicht

beobachtbar waren, zeigt, dass eine Übertragbarkeit auf alle Stämme von *E. coli* sicher ausgeschlossen werden kann. Laut einer Studie sind Polyphenole nur im niedrigen einstelligen Bereich dazu fähig gewesen, eine Vermehrung von *E. coli* zu hemmen. Hierbei wurde eine Konzentration von 2,5 % verwendet (Stoilova et al. 2005), die über der 2 %igen Konzentration in diesem Adhäsionsversuch lag. Da der Effekt bei der genannten Studie konzentrationsabhängig war, wäre es denkbar gewesen, dass die direkten antibakteriellen Fähigkeiten der Polyphenole im Polyphenolextrakt und der Mangoschale bei höheren Konzentrationen zu einem nachweislich verringerten Wachstum hätten führen können. Da grundsätzlich ein Vergleich der Substanzen untereinander stattfinden sollte und die Pektine die Konzentration der Substanzen auf 2 % limitierten, war eine Überprüfung dieser Fragestellung nicht zielführend.

Bei den Ergebnissen fällt auch die konsequent hohe Standardabweichung bei der scheinbaren Anlaufzeit auf. Sie ist Substanz- und Bakterienstamm übergreifend gewesen. Da die Überprüfung auf Effekte immer mit allen Substanzen gleichzeitig mit jeweils zwei verschiedenen randomisiert ausgewählten Bakterienstämmen vorgenommen wurde, handelte es sich bei der Abweichung um einen möglicherweise individuellen Effekt des Versuchsaufbaus an sich, der durch Wiederholungen nicht verhindert werden konnte.

Abschließend lässt sich aus den Ergebnissen der Schluss ziehen, dass alle Substanzen eine Adhäsion von *E. coli* ermöglichen, jedoch für eine Übertragung auf Zustände in-vivo eine differenzierte Betrachtung und weiterer Untersuchungen notwendig macht.

5.3. Diskussionen zu dem Fütterungsversuch

5.3.1. Diskussion zu der Mischgenauigkeit der Futtermischungen für den Fütterungsversuch

Die Messung der Nährstoffgehalte in den verschiedenen Futtermischungen sollte dazu dienen, die Mischgenauigkeit zu überprüfen und eventuelle Effekte auf die homogene Durchmischung aller Futterkomponenten festzustellen. Die Überprüfung der Gehalte der einzelnen Rohnährstoffe in den Diäten (Tabelle 15) nach der Herstellung lässt darauf schließen, dass es bei der Produktion der Diäten keine Unregelmäßigkeiten gab. Für alle Futtermischungen wurden dieselben Chargen an Rohmaterialien verwendet, um Unterschiede durch Herkunft, Reifegrad und Klima auszuschließen. Der Vermahlungsgrad der Futterkomponenten war homogen und ließ keine Selektion einzelner Futterkomponenten durch die Tiere zu. Bei der Wahl der Rohstoffe der Mangoschale ist zu beachten, dass diese vor dem Export nach Deutschland von den Früchten abgetrennt werden mussten, getrocknet und vor der Ausfuhr gemahlen und bestrahlt wurden. Dadurch konnten Prozesse des mikrobiellen Verderbs ausgeschlossen werden. Die depektinisierten und integralen getrockneten und pulverisierten

Mangoschalen wurden zur Beurteilung ihrer Eignung für die Verfütterung an Broiler hinsichtlich ihres Gehalts an Hefen, Schimmelpilzen, Schwermetallen, Gesamtkeimzahl und des Zuckergehalts von dem Labor der LUFA-ITL GmbH kontrolliert und für die Verfütterung an Broiler für geeignet befunden. Der unterschiedliche Zuckergehalt der depektinisierten Mangoschale im Vergleich mit der integralen Mangoschale wurde bei der Erstellung der Rationen berücksichtigt. Bezüglich der Bestrahlung der Mangoschalen hat eine Studie ergeben, dass die Bestrahlung Einfluss auf den Gehalt an Polyphenolen hatte, der bei 3 kGy am höchsten war (Abdeldaiem und Hoda 2012). Die Bestrahlung bei der Ausfuhr der Mangoschalen aus Indien lag bei 5 kGy und könnte damit den Polyphenolgehalt minimal beeinflusst haben.

5.3.2. Diskussion zu den Versuchsbedingungen

Die Haltung der Tiere erfolgte am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin in Bodenhaltung in einem Stall mit insgesamt 24 Boxen. Hiervon waren vier Randboxen nicht belegt, um den Sichtkontakt zwischen den Tiergruppen für alle Tiergruppen gleichermaßen zu ermöglichen. Die Einstreu war ebenfalls bei beiden Durchgängen identisch wie auch alle technischen Geräte wie Waagen, Lampen, etc.

Der Tierversuch wurde aufgrund der fünf Versuchsgruppen zur Erhöhung der Anzahl der Wiederholungen in zwei Durchgängen durchgeführt. Um jahreszeitliche klimatische Schwankungen auszugleichen, erfolgten beide Durchgänge direkt nacheinander im November - Dezember 2013 und Januar - Februar 2014. Die tägliche Gesundheitskontrolle erfolgte durchgehend durch zwei Tierärzte in Verbindung mit den Tierpflegern bei den wöchentlichen Wiegungen.

5.3.3. Diskussion Fütterungsversuch

Die Leistungsdaten umfassten die Tiergewichte, die Gesamtgewichtszunahme, den Futterverbrauch und die Mortalität, während bei den bakteriellen Metaboliten in erster Linie der pH-Wert, nachfolgend Laktat, Ammonium und flüchtige Fettsäuren sowie die Erfassung der quantitativ bedeutsamsten Bakteriengruppen mittels qPCR Hinweise auf Effekte in-vivo beim Broiler geben sollten.

Durchführung des Tierversuchs

Die Durchführung des Tierversuchs erfolgte in einem Stall des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin in Bodenhaltung. Der Versuchsstall gliederte sich in 24 Einzelboxen, wovon jeweils vier Reihen à fünf identischer Einzelboxen mit Sichtkontakt zueinander für die

Durchführung der Tierversuche genutzt wurden. Vier Randboxen blieben unbelegt. Der Versuch wurde aufgrund der Stallgegebenheiten und der Anzahl der Fütterungsgruppen auf zwei Durchgänge verteilt. Jahreszeitlich bedingte klimatische Schwankungen wurden durch eine konsekutive Durchführung in Verbindung mit einem Temperatur- und Beleuchtungsprogramm weitestgehend ausgeschlossen. Sowohl die Reihenfolge der Versuchsgruppen im Stall als auch die Reihenfolge der Probenentnahme bei der Schlachtung erfolgten randomisiert.

Der Fütterungsversuch zur Erhebung der Leistungsdaten, mikrobiologischer Parameter und der bakteriellen Metaboliten wurde mit 2x160 Eintagsküken durchgeführt. Hierbei erfolgte die Verteilung von durchschnittlich acht Eintagsküken auf die einzelnen Boxen und Versuchsgruppen nach dem Zufallsprinzip. Eine geringere Besatzdichte von sieben Tieren in 10 der 20 Versuchsgruppen des zweiten Durchgangs, gleichmäßig verteilt auf die Versuchsgruppen, konnte mit einer fehlerhaften Anlieferung der Tieranzahl begründet werden. Da die Leistungsdaten der kleineren Fütterungsgruppen sich nicht von denen der anderen Boxen im Versuch unterschieden und die Mittelwerte von jeder Box als Versuchseinheit angesehen wurden, konnten die Daten in der Statistik belassen werden. Die Mortalität war in einem normalen Bereich während beider Durchgänge mit 1,79-4,9 %. Die Gruppen A, B und E wiesen demgegenüber eine erhöhte Mortalität innerhalb jeweils einer Box auf, was vor allem auf den Zwischenfall im zweiten Durchgang zurückzuführen war: Bei der Umstellung auf die Nippeltränken kam es bei diesen drei Boxen des zweiten Durchgangs zu vermehrtem Kümern bei 3-5 Tieren / Box, was auf eine mangelhafte Nutzung der funktionierenden Tränken durch die betroffenen Tiere zurückgeführt werden konnte. Die verbliebenen Küken beherrschten den Umgang mit der Tränke, wiesen jedoch ebenfalls eine Gewichtsdivergenz zu den Tiergewichten der Nachbargruppen auf. Diese Differenz wurde auf einen verminderten Nachahmeffekt zurückgeführt. Die Daten dieser Boxen wurden aus den Leistungsdaten entfernt, da dieser Effekt das Studienergebnis verfälscht hätte. Ein Zusammenhang mit der Besatzdichte erscheint auch hier möglich, da solche Vorfälle bei höheren Besatzdichten erfahrungsgemäß nicht auftreten. Auch blieben alle Tiere mit einem durchschnittlichen Endgewicht von 1655 g / Tier weit hinter den Angaben der rassetypischen Mastleistung des Herstellers zurück. Möglicherweise weist auch dieses Ergebnis auf Einflüsse durch die niedrige Besatzdichte hin. Die mit anderen Studien vergleichbar niedrige Besatzdichte von 7 - 8 Tieren / Box in beiden Durchgängen führte zu einem Platzangebot von 262,5 cm² pro Tier. Es existieren bereits verschiedene Studien, die die Leistungsdaten in Bezug auf die Besatzdichte der Tiere und deren Verhalten untersucht haben mit unterschiedlichen Ergebnissen. In der Studie von Thomas (Thomas et al. 2004) ergab sich, dass eine Besatzdichte von fünf Tieren / m² im Vergleich mit einer höheren Besatzdichte (10, 15, 20 Tiere / m²) das schnellste Wachstum während der Starterperiode erzeugten als auch die geringste

Ausprägung von Federpicken und anderen stressassoziierten Beeinträchtigungen des Verhaltens, jedoch die Leistungsdaten insgesamt nicht beeinflusst werden konnten. Eine andere Studie wiederum konnte zeigen, dass bei einer Fläche von 0,054 m² / Tier die Leistungsdaten verglichen mit denen von Tieren mit weniger Platzangebot auch zum Ende der 35. Tage-Mast besser waren (Chmelničná und Solčianska 2007). Eine weitere Studie, die im sehr engen zeitlichen Rahmen ebenfalls in den gleichen Boxen stattfand und mit einer Tierdichte von 17 Tieren / Box arbeitete, zeigte bei gleicher Herkunft der Tiere ein Endgewicht von 2409 g im Mittelwert am Tag 35 (Vodde 2014). Dieses Ergebnis erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Besatzdichte bei der vorliegenden Studie einen großen Einfluss auf die Gesamtzunahme der Tiere hatte, da bis auf die Besatzdichte nur Unterschiede bei den Rationskomponenten, nicht aber bei der energetischen Zusammensetzung als auch bei den dort vorgenommenen Impfungen und Blutentnahmen bestanden. Da die Tiergewichte in der vorliegenden Studie jedoch einheitlich über alle Versuchsgruppen verteilt waren, ist dieser Umstand für das Ergebnis, ob eine Verfütterung von Mangoschalen im Vergleich zur Kontrolle fähig ist, Unterschiede bei den Leistungsdaten, der Mikrobiologie oder der Verdaulichkeit hervorzurufen, nicht von Bedeutung. In der gesamten Studie wurde versucht, Einflüsse auf die Ergebnisse durch einheitliche Haltungsbedingungen auszuschließen, jedoch besteht aufgrund dessen, dass mehrere Versuchsdurchgänge erfolgt sind, immer ein Risiko für Variationen der einzelnen Abläufe.

Ergebnisse der Gesundheitsbeurteilung

Die Gesundheitsbeurteilung ergab bei dem ersten Durchgang, dass ein Küken aufgrund einer massiven Beinfehlstellung aus dem Versuch entfernt werden musste. Im zweiten Durchgang kam es während der Umstellung auf die Nippeltränken in drei Versuchseinheiten (Gruppe A, B und E) zu einem deutlichen Zurückbleiben im Wachstum, obwohl vor der Umstellung der Tränken in jeder Box Tiere fähig waren, Wasser aus den Nippeltränken zu trinken. Da in jeder der betroffenen Versuchsgruppen Tiere mit einer geringen Abweichung des Gewichts auftraten und keine Störungen des Allgemeinbefindens zeigten, wurden sie nach erfolgter Gesundheitsbeurteilung im Versuch belassen. Die Daten dieser Tiere wurden kritisch auf Abweichungen gegenüber den anderen Versuchsgruppen untersucht und es konnten keine Abweichungen festgestellt werden, weshalb diese Daten in der Auswertung der Mikrobiota und Metaboliten enthalten sind.

Leistungsdaten

Eine Beeinflussung der Leistungsdaten durch den Gehalt an depektinierter oder integraler Mangoschale konnte nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis entspricht Literaturdaten bei

der Fütterung von Schalen und Kernen aus Mangos in niedriger Konzentration im Futter von Broilern (Fontes Vieiral et al. 2008). Die depektinisierten Fruchtschalen enthielten mehr Polyphenole durch den Entzug des Pektins als die integrale Mangoschale. Diese Theorie wurde bereits bei weiteren Früchten bestätigt (Schieber et al. 2003 a). Da die Gallotannine der Futtermischungen demnach insbesondere bei den Futtermischungen mit depektinisierten Mangoschalen höher als in der Kontrollfuttermischung gewesen sein dürften, wäre zu erwarten gewesen, dass die Tiere mit diesen Futtermischungen einen höheren Futtermittelverbrauch aufweisen gegenüber der Kontrolle.

Die gesundheitsfördernden Eigenschaften der Mangoschale, welche ausführlich in Kapitel 2.2. geschildert wurden, konnten hier nicht untersucht werden. Hinweise auf die Schutzwirkung der Polyphenole gegenüber Oxidation durch freie Radikale gibt es bereits bei der Betrachtung der Auswirkungen eines polyphenolreichen Extraktes aus der Mango bei anderen Tierarten (Sánchez et al. 2000, Beltran et al. 2004, Garrido et al. 2004, Andreu et al. 2005, Rivera et al. 2011). Bei der Erstellung der Diäten ist die Dosierung von 1–2 % der Mangoschalen niedrig gewählt worden, da es bisher keine Daten über die Verträglichkeit von depektinisierte Schale bei Broilern oder anderen Tierarten gibt.

Auch bei der Fütterung der integralen Mangoschale konnten keine Unterschiede bei der Leistung festgestellt werden. In einer vergleichbaren Studie konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von pulverisierten Mangomehl an Broiler in einem Anteil von 0-5 % in der Diät vertragen wird, jedoch konnte auch hier kein positiver Einfluss auf die Leistungsdaten nachgewiesen werden (Fontes Vieiral et al. 2008).

Möglicherweise fehlt ein positiver Effekt durch die Mangoschalen in dieser Studie aufgrund technisch bedingter Einflüsse während des Verarbeitungsprozesses in der Futterherstellung oder auch durch die enthaltenen antinutritiven Inhaltsstoffe (Pektine). Studien haben gezeigt, dass der Gehalt an hochmethyliertem Pektin zu einer Erhöhung der Viskosität des Darminhaltes führen kann. Dieser Effekt konnte auf eine Modifikation der Darmschleimhaut sowie der mikrobiellen Zusammensetzung zurückgeführt werden, da eine Förderung der Populationen der Enterokokken, *Bacterioidaceae*, Clostridien und *E. coli* beobachtet werden konnte. Eine Zunahme der Organgewichte, insbesondere des Ileums konnte nachgewiesen werden (Langhout und Schutte 1996, Langhout et al. 1999). Da die Organgewichte in der vorliegenden Studie nicht ermittelt wurden, ist eine Beeinflussung bzw. Verzerrung der Leistungsdaten aufgrund höherer Darmgewichte bei den Fütterungsgruppen mit Pektinen in der Futtermischung nicht ausschließbar gewesen. Pektine mit einem hohen Veresterungsgrad sind als Zusatz zum Broilerfutter ungeeignet und können deutlich negative Auswirkungen auf die Tiergesundheit und Mastleistung haben. Auch ein geringerer Gehalt von höchstens 0,05 % Pektin in der Futtermischung mit integraler Mangoschale könnte bei dieser Studie in den Fütterungsgruppen B und D die Morphologie der Darmschleimhaut beeinflusst haben, indem

sich eine Veränderung der Zottenlänge und Kryptentiefe sowie der Anzahl der Becherzellen auf das Gewicht der Därme auswirkte. Hierdurch würden die positiven Eigenschaften der enthaltenen Polyphenole in der integralen Mangoschale auch in einer niedrigeren Konzentration auf die Gewichtszunahme durch die veränderten Darmgewichte überlagert werden und weder positiv noch negativ in den Leistungsdaten widerspiegelt werden. Pektine zeigen zudem den sogenannten Käfigeffekt (Schurz 1997): Sie umhüllen folglich Nährstoffe wie Fette, Proteine und Stärke, wodurch diese Nährstoffe nicht vollständig verdaut werden können. Gepaart mit dem Umstand, dass Nicht-Stärke-Polysaccharide über ein hohes Quell- und Bindungsvermögen verfügen und so zu einer verminderten Durchmischung des Futterbreis mit Verdauungsenzymen führen (Fengler und Marquardt 1988), könnten so wiederum positive Effekte durch die enthaltenen Polyphenole verdeckt worden sein.

Die Körpermasse von 1655 g blieb in allen Fütterungsgruppen unter den Erwartungen von dem vom Erzeuger angegebenen Endgewicht von 2217 g für diese Genetik (Cobb-Vantress.com 2012). Da dies auch bei der Kontrollgruppe der Fall war, kann diese Abweichung nicht auf die zu untersuchenden Futterzusätze zurückgeführt werden. Es ist denkbar, dass die Besatzdichte in Gruppen von 7-8 Tieren pro 2,1 qm Einfluss auf das Verhalten der Tiere bezüglich des Ruheverhaltens und der Futteraufnahme sowie des Erlernens der Bedienung der Tränke hatte und zu einem verminderten Konsum von Wasser und Futter führte. Es konnte bereits in der Literatur gezeigt werden, dass eine niedrigere Besatzdichte gegenüber einer höheren, Unterschiede in der Gewichtsentwicklung induzierte (Mitrovic et al. 2010). Weitere Einflüsse aufgrund der Haltungsbedingungen könnten möglicherweise zusätzlich die Effekte durch die Zulagen der Mangoschale überlagert haben. Ein Einfluss der schrotförmigen Beschaffenheit des Futters auf die Leistungsdaten ist unwahrscheinlich, da eine frühere Studie keinen Zusammenhang der Futterbeschaffenheit und Partikelgröße mit den Leistungsdaten bei Legehennen zeigen konnte (Ruhnke et al. 2015). Die Gesamtanzahl mit 7-8 Replikaten pro Versuchsfutter in zwei Durchgängen ist als gering einzustufen. Möglicherweise wäre es bei größeren Tiergruppen und mehreren Wiederholungen zu anderen Ergebnissen gekommen. Zusammenfassend kann aufgrund des Fehlens von Unterschieden zwischen den Fütterungsgruppen von einer guten Verträglichkeit geringer Mengen an Mangoschale in der Ernährung von Broilern ausgegangen werden.

Laktat und pH-Wert

Die vergleichbar niedrigen Laktat-Gehalte im Zäkum und Rektum waren zu erwarten, da Laktat in diesen Darmabschnitten nur in sehr geringer Menge produziert wird und somit kaum nachweisbar ist (Terada et al. 1994, Józefiak et al. 2006). Häufig kann es sogar überhaupt nicht nachgewiesen werden (Engberg et al. 2002, Engberg et al. 2004, Rehman et al. 2007).

Dass die Zulage von Pektinen keinen Einfluss auf die Produktion von Laktat im Dünndarm hatte, konnte bereits früher gezeigt werden (Romruen et al. 1988), in der vorliegenden Studie konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine Zulage in Höhe von 2 % integraler oder depektinierter Mangoschale zu einer signifikanten Absenkung der D-Laktatgehalte im Rektum führte. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass die Laktatgehalte als Indikator für die bakterielle Zusammensetzung und den Anteil Milchsäure bildender Bakterien beeinflussbar waren. Hierbei spielte die Behandlung des Futters bei der Herstellung als auch die Zusammensetzung eine bedeutende Rolle. Höhere Werte waren in der Kontrollgruppe und in den Fütterungsgruppen mit einer 1 %igen Zulage an integraler und depektinierter Mangoschale nachzuweisen. Alle Futtermittelvarianten wurden mit denselben Rohstoffkomponenten hergestellt. Hieraus kann geschlossen werden, dass erst ab einer Zulage von 2 % eine nachhaltige Beeinflussung der Laktatbildner erfolgt. Eine Absenkung der Laktobazillen konnte jedoch bei der Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung nicht festgestellt werden. Da Laktobazillen die hauptsächlichen Produzenten von Laktat sind und je nach Typ D- oder L-Laktat produziert wird, wäre es denkbar, dass die D-Laktatbildner durch die Zulage von 2 % der Mangoschalen in ihrem Stoffwechsel beeinflusst wurden, die L-Laktat bildenden Bakteriengruppen jedoch nicht.

Der pH-Wert konnte durch keine Fütterungsvariante beeinflusst werden. Der pH-Wert wurde in den bisherigen Fütterungsstudien mit Mangoschalen an Broilern bisher nicht gemessen bzw. war in früheren Studien teilweise auch nicht messbar aufgrund der erhöhten Viskosität durch das Pektin. Daher bleibt nur ein Vergleich mit Studienergebnissen mit Legehennen und einer anderen Pektinquelle. Durch eine Zulage von 2 % Zitruspektin waren in einer Studie minimale Einflüsse auf den pH-Wert festzustellen (Romruen et al. 1988). In den Versuchsfuttern lag der Pektingehalt bei höchstens 0,05 %. Um den pH-Wert der Digesta nachhaltig zu beeinflussen, wäre eine höhere Zulage an Mangoschale notwendig gewesen. Dieses hätte allerdings eine Abdeckung des Bedarfs an Nährstoffen der wachsenden Tiere möglicherweise beeinträchtigt und wäre mit einer Leistungsdepression einhergegangen.

Ammonium

Ammonium entsteht als Abbauprodukt bei der mikrobiellen Verwertung von unverdaulichem Eiweiß, insbesondere wenn Protein im Überschuss vorhanden ist. Zu den Hauptproduzenten zählten *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp. und *Bacteroides* spp. (Romruen et al. 1988, Macfarlane et al. 1992). Ammoniak wird über die Darmwand aufgenommen und zeigt negative Effekte auf die Gesundheit des Wirtes (Macfarlane und Macfarlane 1995). Eine Veränderung der Ammoniumgehalte im Darmtrakt kann demnach ein Hinweis auf eine negative Veränderung in der Fermentation und damit einhergehende Veränderungen der bakteriellen Flora des Darminhaltes sein. In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten

Veränderungen hinsichtlich des Ammoniums festgestellt werden. Die enthaltenen Tannine sollen laut Literatur dazu fähig sein, die Verdaulichkeit von Protein durch die Bildung von Komplexen herabzusetzen (Hagerman 1992).

Flüchtige, kurzkettige Fettsäuren (SCFA)

Essigsäure war im Ileum bei den Fütterungsgruppen C - E (dep. Mangoschale 1 & 2 %, Mangoschale 2 %) weniger nachzuweisen als in der Kontrollgruppe. Eine Absenkung des Gesamtgehalts an SCFA durch die Fütterung von depektinierter Mangoschale in Höhe von 2 % konnte im Zäkum gegenüber den Proben von der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Bei der Messung der SCFA wäre ein größerer Einfluss des enthaltenen Pektins auf die Zusammensetzung der SCFA im Zäkum denkbar gewesen (Romruen et al. 1988, Langhout und Schutte 1996). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Pektine die Konzentrationen von SCFA beeinflussen können (Wagner und Thomas 1978, Romruen et al. 1988, Engberg et al. 2002, Engberg et al. 2004). Dieses konnte jedoch in den eigenen Daten nur eingeschränkt bestätigt werden. Pektine können für eine Erhöhung der SCFA im Zäkum verantwortlich sein, jedoch keine Erhöhung in den vorderen Darmabschnitten bewirken (Romruen et al. 1988, Romruen et al. 1988). Hier wurde durch eine pektinhaltige Fütterung eine erhöhte Produktion von Buttersäure im Zäkum festgestellt, während die eigenen Ergebnisse lediglich eine Veränderung der Essigsäure im Ileum zeigen.

Von der Grundthese ausgehend, dass Pektine den Gehalt an SCFA steigern sollten (Langhout und Schutte 1996), hätten hier Unterschiede nachweisbar sein müssen. Widererwartend erzielte die Fütterungsgruppe mit Mangoschale 2 % allerdings die gleichen Werte wie die Gruppen mit depektinierter Mangoschale 1 %, obwohl Pektin in den Mangoschalen enthalten war. Das Ergebnis, dass eine Zulage von depektinierter Mangoschale 2 % hier signifikant niedrigere Werte aufweist, stand folglich zu erwarten. Bei den Studien von Langhout wurden bis zu 5 % reines Pektin zugesetzt (Langhout et al. 1999), jedoch fehlt ein Vergleich mit depektinisierten Futtermitteln bisher gänzlich in der Literatur. Diese neuen Ergebnisse könnten zusätzlich beeinflusst worden sein durch die individuell anders zusammengesetzte mikrobielle Flora der Versuchstiere. Beispielsweise konnten Veränderungen der SCFA auf zahlreiche Wirt-Mikrobiota Interaktionen wie antibakterielle Effekte zurückgeführt werden (Mroz et al. 2006). Generell wird ihre Produktion und Zusammensetzung multifaktoriell durch den Wirt, die Fütterung, Fermentationsrate und mikrobielle Faktoren beeinflusst (Allison und Macfarlane 1989, Mroz et al. 2006). Die Gehalte an Essigsäure, Propion- und Buttersäure im Ileum sind denen aus anderen Studien ähnlich (Engberg et al. 2002, Silva und Smithard 2002, Taylor und Jones 2004). In den Blinddärmen sind die Werte gegenüber früheren Studien ebenfalls

vergleichbar gewesen (Ricke et al. 1982, Engberg et al. 2002) und es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Messungen korrekt verliefen.

Quantitative Erfassung der Bakteriengruppen in der Digesta

Bei der Messung der verschiedenen Bakteriengruppen wurden Gruppenprimer für verschiedene Clostridien, Enterobakterien und Laktobazillen verwendet. Hierbei sollte gezeigt werden, ob depektinisierte oder integrale Mangoschalen einen Einfluss auf die Populationszusammensetzung dieser Bakteriengruppen haben können.

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Fütterung von Nicht-Stärke-Polysacchariden wie Pektinen einen präbiotischen Effekt auf die Darmflora von Broilern hatte (Langhout und Schutte 1996, Langhout et al. 1999). So wurden zum Beispiel eine Minderung der mikrobiellen Aktivität und eine Veränderung der Populationen von Enterokokken, *Bacteroidaceae*, Clostridien und *E. coli* im Ileum beobachtet, wenn hochmethyliertes Pektin aus Zitrusfrüchten in den Rationen für Broiler enthalten waren. Hierbei wurde eine 3 %ige Pektinzulage aus Zitrusfrüchten gefüttert (Langhout et al. 1999). Das Pektin der Mangoschale ist ebenfalls hochmethyliert und in einem Umfang von 0,05 % in den Rationen enthalten gewesen. In einer Studie an Broilern konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Fütterung von Pektin sogar zu einer Steigerung der Clostridienpopulation führen konnte (Wagner und Thomas 1978). Eine Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung konnte in der eigenen Studie nicht bestätigt werden. Möglicherweise war die Dosierung zu gering gewählt, um entsprechende Veränderungen zu bewirken. Auch antibakterielle Effekte durch Polyphenole wurden bereits gegenüber verschiedener Bakterienspezies, darunter auch *E. coli* und Clostridien, nachgewiesen (Stoilova et al. 2005, Akinpelu und Onakoya 2006, Bbosa et al. 2007). Die Studienlage ist divers und das Ergebnis, dass keine der getesteten Bakteriengruppen durch die Zulage an depektinierter oder integraler Mangoschale gegenüber der Kontrollgruppe beeinflussbar war, zeigt die hohe Stabilität der erfassten Bakteriengruppen. Möglicherweise spielte auch hier die Konzentration der Mangoschalen eine Rolle, da in den genannten Studien meistens ein Reineextrakt an Polyphenolen genutzt wurde. Es könnte auch zu Verschiebungen der verschiedenen Bakterien innerhalb einer Bakteriengruppe gekommen sein, was durch die Messung gleich mehrerer Bakterien innerhalb einer Gruppe nicht nachweisbar ist.

5.3.4. Diskussion scheinbare präzäkale Verdaulichkeit

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte festgestellt werden, dass sich keine Veränderungen der Trockenmasse der Ingesta bei Zulagen der Mangoschalen bis zu einer Menge von 2 % ergaben. Der Gehalt an Pektinen belief sich hierbei auf maximal 0,05 % bei der Fütterungsgruppe mit 2 % integraler Mangoschale. Frühere Studien konnten zeigen, dass

die Trockenmasse des Darminhaltes bei Broilern durch die Fütterung von Pektinen abnehmen kann. Bei einem Gehalt von 2 % Zitruspektin, welches von der Zusammensetzung her dem Pektin der Mango sehr ähnlich ist, wurde eine Verminderung der Trockenmasse in den Exkrementen im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Broilern als auch bei Legehennen nachgewiesen (Romruen et al. 1988, Langhout et al. 1999). Dieser Effekt wurde von den Autoren auf Veränderungen der Darmwandmorphologie mit einer Verdickung der Darmwand des Jejunums, mit einer Verlängerung der Darmzotten als auch einer Vertiefung der Darmkrypten in diesem Bereich zurückgeführt, wobei hierbei eine Vermehrung der Becherzellen eintrat, die für eine vermehrte Produktion von Darmsekreten ab einer Menge von 2-6 % Pektinen in der Fütterung und somit für die Verringerung des Trockenmassegehalts verantwortlich waren (Langhout et al. 1999). Da diese Effekte bereits bei hohen Gaben an Pektinen bekannt waren, wurde in dieser vorliegenden Studie versucht, die negativen Auswirkungen auf die Verdaulichkeit beim Broiler durch eine geringere Menge enthaltener Pektine zu vermeiden. Mögliche Einflüsse der Polyphenole durch die eingesetzten relativ kleinen Mengen depektinsierter Mangoschalen im Futter waren bei der präzökalen Verdaulichkeit einiger Aminosäuren und bei der Gesamtverdaulichkeit an Rohprotein nicht auszuschließen. Höhere Werte zeigten sich in der Kontrollgruppe gegenüber den Fütterungsgruppen mit depektinsierter Mangoschale 1 und 2 % als Supplement. Ursache könnte der erhöhte Gehalt an Polyphenolen bei den depektinsierten Mangoschalen sein, da die Effekte bei der Fütterung der integralen Mangoschalen nicht in diesem Ausmaß zu beobachten waren. Durch den Entzug des Pektins werden die anderen Bestandteile der Mangoschale konzentrierter, was diese Beobachtung erklären kann. Den Zusammenhang zwischen der Depektinisierung von Apfeltrestern und dem daraus folgenden erhöhten Gehalt an Polyphenolen konnte eine frühere Studie bereits bestätigen (Schieber et al. 2003 a).

Es existieren Studien, in denen bei der Inklusion von Polyphenolen aus Mangokernen eine Absenkung der Verdaulichkeit von Rohprotein bei Hühnern festgestellt wurde (Ravindran und Sivakanesan 1996). Dieser Effekt konnte von den Autoren auf den Gehalt an Gallotanninen zurückgeführt werden. Gallotannine können die Proteinverdauung durch die Inaktivierung von Trypsin als auch durch eine Vernetzung der Proteine beeinträchtigen (Hagerman 1992, Ravindran und Sivakanesan 1996). Die Verdaulichkeit von Proteinen im Futter von Broilern war mit dem steigenden Anteil von Mangoschalen und Kernen in der Ration bereits ab einem Gehalt von 5 % reduziert (Tyohemba Orayaga et al. 2015). Bei genauerer Betrachtung, woher diese verminderte Proteinverdaulichkeit der Mangoschalen resultiert, wurde in der vorliegenden Studie erstmals eine Verschiebung der Verdaulichkeit einzelner Aminosäuren durch die Fütterung polyphenolreicher Mangoschalen nachgewiesen. Dieser Effekt war bei den Futtergruppen mit depektinsierter Mangoschale in der Ration bei 1 % und 2 % am deutlichsten. Die polyphenolreichen depektinsierten Mangoschalen in Höhe von 2 % konnten

eine verminderte scheinbare präzäkale Verdaulichkeit bei den Aminosäuren Arginin, Histidin, Phenylalanin, Prolin und Serin gegenüber der Kontrollgruppe herbeiführen. Die Fütterungsgruppe mit depektinierter Mangoschale 1 % zeigte eine verminderte präzäkale Verdaulichkeit bei den Aminosäuren Histidin, Prolin und Threonin im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Aminosäuren Tyrosin und Serin zeigten beide Fütterungsgruppen mit depektinierter Mangoschale Unterschiede gegenüber der Mangoschale 1 % und der Kontrolle. Es erscheint möglich, dass der steigende Anteil der Polyphenole in der depektinisierten Mangoschalenfütterung hierfür verantwortlich ist.

Veränderungen in der Aminosäurenverdaulichkeit bei Broilern, die auf den Gehalt an Polyphenolen, insbesondere der Gallotannine zurückzuführen waren, konnten bereits bei anderen tropischen Früchten nachgewiesen werden: In einer Studie an Broilern mit einem polyphenolreichen Extrakt aus Grapefruits, deren einzelne Polyphenole denen der Mango zum größten Teil identisch sind, konnte nachgewiesen werden, dass die Verdaulichkeit von Arginin, Histidin, Phenylalanin, Cystein und Glutamin sowie Prolin durch die Supplementierung von 5 g Extrakt / kg Futter gegenüber der Kontrollgruppe abnahm. Ein quadratischer Effekt wurde mit steigenden Konzentrationen des Extraktes bei Cystein und Glycin beobachtet (Chamorro et al. 2013). Die Aminosäure Prolin war sowohl bei Fütterung der depektinisierten Mangoschale 1 % als auch bereits bei der integralen Mangoschale 2 % weniger verdaulich gegenüber der Kontrollgruppe und der Mangoschale 1 %. Da unter den enthaltenen Polyphenolen insbesondere die Gallotannine Eigenschaften besitzen, die im Darm zu einer verminderten Proteinverdauung führen (Hagerman 1992), könnten diese von besonderer Bedeutung gewesen sein. Da die Zulage der Mangoschalenvarianten jedoch nicht zu einer Veränderung der Gesamtleistung der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe führte, ist davon auszugehen, dass die Verdaulichkeit von Protein und Aminosäuren immer noch ausreichend in Relation zur Leistung war. Als interessanten Ausblick kann die Möglichkeit angesehen werden, Gallotannine durch thermische oder radiologische Prozesse zu inaktivieren, um sie in höheren Mengen verfüttern zu können, ohne negative Effekte auf die Leistung der Tiere in Kauf nehmen zu müssen. Durch Autoklavierung als auch Bestrahlung und Kochen verlieren Gallotannine ihre antinutritiven Eigenschaften in der Fütterung von Broilern (Farag 2001). Um mögliche positive Effekte erwarten zu können, müsste vorab geklärt werden, inwieweit auch nützliche Eigenschaften der anderen Polyphenole, wie dem Mangiferin, hierbei verloren gehen.

6. Zusammenfassung

Depektinisierte und integrale Mangoschalen in der Ernährung von Broilern

Verschiedenen Untersuchungen zufolge enthalten Mangoschalen hohe Mengen an gesundheitsförderlichen Substanzen wie Pektinen und Polyphenolen. Verschiedene Studien an Hühnern konnten bereits zeigen, dass die Fütterung von Pektinen abhängig von der Menge auch negative Effekte als Nicht-Stärke-Polysaccharide auf die Leistung haben können. Mögliche positive Effekte auf die Mikrobiota oder die Gewichtsentwicklung durch die enthaltenen anderen Inhaltsstoffe können hierbei maskiert worden sein.

Das Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob depektinisierte oder integrale Mangoschalen in der Ernährung von Broilern sinnvoll einsetzbar sind. Mögliche Effekte sollten vorab durch In-vitro-Versuche geklärt werden. Ferner wurden die scheinbare präzäkale Verdaulichkeit der Nährstoffe und der Einfluss auf die intestinale Mikrobiota sowie die Konzentrationen mikrobieller Metaboliten in einem Fütterungsversuch untersucht.

In-vitro wurde ein semi-anaerobes Fermentationsmodell mit Zäkuminhalt von Broilern aus pektin- und mangoschalenfreier Fütterung mit fünf Testsubstanzen (Apfelpektin, Mangopektin, Mangoschale, Mangopolyphenole und Glukose) genutzt, um erste Hinweise auf die mikrobielle Fermentierbarkeit zu bekommen. Mangopektin erzeugte im Vergleich mit Polyphenolen und Mangoschale eine stärkere Absenkung des pH-Werts, Apfelpektin ergab die höchsten pH- und Ammoniumwerte und verhielt sich gegenüber dem Mangopektin unterschiedlich. Die Fermentation von Mangopektin resultierte in den höchsten Konzentrationen von Essigsäure im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen (Polyphenole und Mangoschale).

In einem weiteren In-vitro-Versuchsansatz wurden Mikrotiterplatten mit denselben Substanzen wie im ersten Versuch beschichtet. Es wurde eine Infektion mit fünf verschiedenen Stämmen von aviären *Escherichia coli* nachgeahmt. Die Ergebnisse zeigten, dass es geringe Unterschiede bei Beschichtung mit Apfelpektin gegenüber Polyphenolen und Mangoschalen gab. Allerdings waren die Ergebnisse untereinander recht ähnlich, sodass sich keine klaren Schlussfolgerungen hinsichtlich der Adhäsion von Bakterien an die verschiedenen Substrate ergaben.

In einem Fütterungsversuch wurden 320 Broiler über 35 Tage mit vier Versuchsfuttern gefüttert, die 1 oder 2 %ige integraler oder depektinisierte Mangoschale enthielten. Zur Kontrolle diente eine Fütterungsgruppe ohne Mangoschalen oder Pektine in der Ration. Es konnten durch die Diäten keine Einflüsse auf die Leistung nachgewiesen werden. Die

Versuchsgruppen mit einem 2 %igen Anteil integraler und depektinierter Mangoschale wiesen niedrigere Werte bei D-Laktat im Rektum auf als die anderen Gruppen. Auch bei Essigsäure wiesen die Gruppen mit depektinierter Mangoschale (1 und 2 %) sowie Mangoschale 2 % niedrigere Gehalte im Zäkum gegenüber der Kontrolle auf. Der Gesamtgehalt kurzkettiger Fettsäuren im Zäkum war bei Fütterung von 2 % depektinierter Mangoschale niedriger als in der Kontrollgruppe. Eine Veränderung von Enterobakterien, Clostridien und Laktobazillen im Intestinaltrakt konnte durch die unterschiedlichen Fütterungsvarianten nicht nachgewiesen werden. Depektinisierte Mangoschale in Höhe von 2 % hatte einen negativen Effekt auf die ileale scheinbare Aminosäurenverdaulichkeit. Trotz dieser geringeren Verdaulichkeit führte die Fütterung von depektinierter Mangoschale und integraler Mangoschale in den genannten Größenordnungen von 1 bis 2 % nicht zu einer negativen Beeinflussung der Mastleistung. Daher ergibt sich als Schlussfolgerung, dass die geprüften Produkte in der Fütterung von Broilern prinzipiell gut einsetzbar sind, allerdings müssen Fragen zu den gesundheitlichen Effekten weiter geprüft werden.

7. Summary

Lau, Erin:

Depectinized and integral mangopeels in the diet of broiler chickens

According to various studies, mangopeels contain high amounts of health-promoting substances such as pectins and polyphenols. However, in several studies on chicken, the feeding of pectin as a non-starch polysaccharide could have a negative impact on the performance of broiler chickens, depending on its concentration in the food. Thus, it is possible that positive effects of other ingredients on the microbiota or on weight gain may have been masked. The aim of this study was the evaluation of the benefits of depectinized or integral mangopeels in the nutrition of broilers. Possible effects were examined beforehand by in-vitro tests. In addition, the apparent ileal digestibility of the nutrients and their influence on the intestinal microbiota as well as the concentration of microbial metabolites were analyzed in a feeding experiment.

To get a first indication of microbial fermentability, a semi-anaerobic fermentation model was used in an in-vitro trial. The cecal content of broilers from pectin-free and mangopeel-free feeding was inoculated with five test substances (apple pectin, mangopectin, mangopeel, mangopolyphenols and glucose). Mangopectin produced a higher reduction in pH as compared to polyphenols and mangopeels. Apple pectin resulted in the highest pH and

ammonium values and behaved inconsistently towards mangopectin. The fermentation of mangopectin resulted in the highest concentrations of acetic acid compared to the other test substances (mangopolyphenols and -peel).

In a second in-vitro experiment, microtiter plates were coated with the same substances as in the first experiment. An infection with five different strains of avian *Escherichia coli* was imitated. The results showed that there were only minor differences in apple pectin versus polyphenol and mango peel coating. However, as all results were very similar to each other, no clear conclusions could be reached regarding the adhesion of bacteria to the different substrates.

In a feeding experiment, 320 broilers were fed for 35 days with four different diets containing 1 or 2 % integral or depectinized mango peels. A feeding group without mango peels or pectins in the ration was used as a control. The different diets had no influence on the performance. The test groups with a 2 % content of integral and depectinized mango peels had lower values for D-lactate in the rectum than the other groups. The groups with depectinized mango peels (1 and 2 %) and 2 % mango peels showed lower levels of acetic acids in the caecum compared to the control group. The total amount of short-chain fatty acids in the cecum was lower when feeding 2 % of depectinized mango peels. A modification in the populations of enterobacteria, clostridia and lactobacilli in the intestinal tract due to the different feeding variants could not be detected. Depectinized mango peels with a level of 2 % had a negative effect on the apparent ileal amino acid digestibility. Despite this lower digestibility, the feeding of depectinized and integral mango peels with a level of 1 to 2 % did not have any negative effect on the weight performance during the trial period of 35d. It can be stated that the products tested in this study can be used well in the feeding/fattening of broilers, but that further research into their effects on the health of broilers is necessary.

8. Literaturliste

- Abdeldaiem, M. H. and G. M. A. Hoda (2012). Use of irradiated Mango (*Mangifera indica*) peels powder as potential source of dietary fiber and antioxidant in beef burger. *Journal of Applied Sciences Research* **8**(7): S. 3677-3687.
- Ajila, C. M., S. G. Bhat and U. J. S. Prasada Rao (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry* **102**(4): S. 1006-1011.
- Ajila, C. M. and U. J. S. Prasada Rao (2013). Mango peel dietary fibre: Composition and associated bound phenolics. *Journal of Functional Foods* **5**(1): S. 444-450.
- Akinpelu, D. A. and T. M. Onakoya (2006). Antimicrobial activities of medicinal plants used in folklore remedies in south-western. *African Journal of Biotechnology* **5**(11): S. 1078-1081.
- Allison, C. and G. T. Macfarlane (1989). Influence of pH, nutrient availability and growth rate on amine production by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**(1): S. 2894-2898.
- Amerah, A. M., V. Ravindran and R. G. Lentle (2009). Influence of insoluble fibre and whole wheat inclusion on the performance, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. *British Poultry Science* **50**(3): S. 366-375.
- Andreu, P., G. Delgado, R. Velho, J. Inada, N. M. Curti, C. Vercesi and A. E. (2005). *Mangifera indica* L. extract (Vimang) inhibits Fe²⁺-citrate-induced lipoperoxidation in isolated rat liver mitochondria. *Pharmacological Research* **51**(5): S. 427-435.
- Awad, W. A., E. Razzazi-Fazeli, J. Bohm and J. Zentek (2008). Effects of B-trichothecenes on luminal glucose transport across the isolated jejunal epithelium of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **92**(3): S. 225-230.
- Azevêdo, J. A. G., S. d. C. Valadares Filho, D. d. S. Pina, E. Detmann, R. F. D. Valadares, L. G. R. Pereira, N. K. d. P. Souza and L. F. Costa e Silva (2011). Intake, total digestibility, microbial protein production and the nitrogen balance in diets with fruit by-products for ruminants. *Revista Brasileira de Zootecnia* **40**(5): S. 1052-1060.
- Barnes, E. M. and C. S. Impey (1970). The isolation and properties of the predominant anaerobic bacteria in the caeca of chickens and turkeys. *British Poultry Science* **11**(4): S. 467-481.
- Barreto, J. C., M. T. S. Trevisan, W. E. Hull, G. Erben, E. S. de Brito, B. Pfundstein, G. Würtele, B. Spiegelhalder and R. W. Owen (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(14): S. 5599-5610.
- Bbosa, G. S., A. Lubega, N. Musisi, D. B. Kyegombe, P. Waako, J. Ogwal-Okeng and O. Odyek (2007). The activity of *Mangifera indica* L. leaf extracts against the tetanus causing bacterium, *Clostridium tetani*. *African Journal of Ecology* **45**(3): S. 54-58.
- Bearse, G. E., V. L. Miller and C. F. McClary (1940). The cannibalism preventing properties of the fiber fraction of oat hulls. *Poultry Science* **19**(3): S. 210-215.
- Becker, P. M., S. Galletti, P. J. Roubos-van den Hil and P. G. Van Wikselaar (2007). Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. *Journal of Applied Microbiology* **103**(6): S. 2686-2696.

Beltran, A. E., Y. Alvarez, F. E. Xavier, R. Hernanz, J. Rodriguez, A. J. Nunez, M. J. Alonso and M. Salaices (2004). Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). European Journal of Pharmacology **499**(3): S. 297-305.

Berardini, N. (2005). Characterisation of phenolic compounds and pectin from mangoes (*Mangifera indica* L.) and their recovery from processing byproducts. Dissertation. Universität Hohenheim, Deutschland.

Berardini, N., R. Carle and A. Schieber (2004). Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom **18**(19): S. 2208-2216.

Berardini, N., R. Fezer, J. Conrad, U. Beifuss, R. Carle and A. Schieber (2005). Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(5): S. 1563-1570.

BMELV - Referat 422 (2008, 2011). Nationale Jahreseinfuhrstatistik, Internetquelle, abgerufen am 17.05.2013, <http://berichte.bmelv-statistik.de/AHB-0033401-2011.pdf>

BMELV (2016). Einfuhr von Guaven, Mangos nach Deutschland in den Jahren 2011 bis 2015. D. M. Richter. Internetquelle, abgerufen am 20.03.2017, <https://www.genesis-online.de>

Brenes, A., A. Viveros, I. Goñi, C. Centeno, S. G. Sáyago-Ayerdy, I. Arijá and F. Saura-Calixto (2008). Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. Poultry Science **87**(2): S. 307-316.

Bresinsky, A., C. Körner, J. W. Kadereit, G. Neuhaus and U. Sonnewald (2008). Strasburger - Lehrbuch der Botanik, 36. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland S.1179.

Brucker, L. (2016). Untersuchungen zur Eignung von Mangoschalen (*Mangifera indica* L.) in der Tierernährung und deren Einfluss auf die zootechnische Leistung sowie verdauungsphysiologische und mikrobiologische Parameter bei Absetzferkeln. Dissertation. Universität Hohenheim, Deutschland.

Chamorro, S., A. Viveros, C. Centeno, C. Romero, I. Arijá and A. Brenes (2013). Effects of dietary grape seed extract on growth performance, amino acid digestibility and plasma lipids and mineral content in broiler chicks. Animal Research **7**(4): S. 555-561.

Chmelničná, L. and L. Solčianska (2007). Relationship between cage area and yield of the (main elements of chicken carcasses. Polish journal of food and nutrition sciences **57**(4): S. 81-83.

Cobb-Vantress.com. (2012). Broiler performance & nutrition supplement. Internetquelle, abgerufen am 21.10.2013, <http://www.cobb-vantress.com/products/cobb-500>.

Dawson, W. R. and G. C. Whittow (2000). Regulation of body temperature. Sturkie's Avian Physiology, Academic Press, San Diego, USA, Fifth Edition, Chapter 14, S.344-379.

De La Cruz Medina, J. and H. S. García (2002). Mango: Post-harvest operations. AGSI/FAO. Internetquelle, abgerufen am 06.05.2012, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Mango.pdf

Diarra, S. S. and B. A. Usman (2008). Growth performance and some blood variables of broiler chickens fed raw or boiled mango kernel meal. *International Journal of Poultry Science* **7**(4): S. 315-318.

Don, S. M. (2008). Optimal conditions for the growth of *E. coli*
El Alaily, H. A., A. Anwar and I. El Banna (1976). "Mango seed kernels as an energy source for chicks." *British Poultry Science* **17**(2): S. 129-133.

Engberg, R. M., M. S. Hedemann and B. B. Jensen (2002). The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science* **43**(4): S. 569-579.

Engberg, R. M., M. S. Hedemann, S. Steinfeldt and B. B. Jensen (2004). Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. *Poultry Science* **83**(6): S. 925-938.

EU-Aktuell. (2015). EU: Mangos aus Indien können wieder importiert werden. Internetquelle, abgerufen am 18.04.2016, <http://www.fruchtportal.de/news/artikel/012332/eu-mangos-aus-indien-konnen-wieder-importiert-werden>.

Ewers, C., T. Janssen, S. Kiessling, H. C. Philipp and L. H. Wieler (2004). Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary microbiology* **104**(1-2): S. 91-101.

Farag, M. and H. Daa El-Din (2001). The enhancement of the nutritive value of mango seed kernels for poultry by thermal treatment and radiation processing. *Archiv für Tierernährung* **54**(1): S. 61-79.

Farag, M. D. (2001). The enhancement of the nutritive value of mango seed kernels for poultry by thermal treatment and radiation processing. *Archiv für Tierernährung* **54**(1): S. 61-79.

Fasoli, E. and P. G. Righetti (2013). The peel and pulp of mango fruit: A proteomic samba. *Biochimica et Biophysica Acta* **1834**(12): S. 2539-2545.

Fengler, A. I. and R. R. Marquardt (1988). Water-soluble pentosans from rye. II. Effects on rate of dialysis and on the retention of nutrients by the chick. *Cereal Chemistry*. **65**(4): S. 298-302.

Ferrara, F. (2012). Untersuchungen zum Einsatz von mittelkettigen Fettsäuren und kurzkettigen organischen Säuren in der Fütterung von Absetzferkeln. Dissertation. Freie Universität Berlin, Deutschland.

Fontes Vieiral, P. A., J. H. de Queiroz, L. F. Teixeira Albino, G. H. Kling de Moraes, A. de Almeida Barbosa, E. Sialino Müller and M. T. dos Santos Viana (2008). Effects of inclusion of mango residues on performance of broilers chickens from 1 to 42 days. *Revista Brasileira de Zootecnia* **37**(12) S. 2173-2178.

Freitas, E. R., A. da Silva Borges, A. L. Pereira, V. K. Abreu, M. T. Trevisan and P. H. Watanabe (2015). Effect of dietary ethanol extracts of mango (*Mangifera indica* L.) on lipid oxidation and the color of chicken meat during frozen storage. *Poultry Science* **94**(12): S. 2989-2995.

Gaertner, S. (2011). Untersuchungen zur Wirkung pflanzlicher Futterzusatzstoffe auf verdauungsphysiologische, mikrobiologische und immunologische Parameter bei Absetzferkeln. Dissertation. Freie Universität Berlin, Deutschland.

- Garrido, G., D. Gonzalez, Y. Lemus, D. Garcia, L. Lodeiro, G. Quintero, C. Delporte, A. J. Nunez-Selles and R. Delgado (2004). In-vivo and in-vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Pharmacological Research* **50**(2): S. 143-149.
- Goodarzi Borojeni, F., W. Vahjen, A. Mader, F. Knorr, I. Ruhnke, I. Rohe, A. Hafeez, C. Villodre, K. Manner and J. Zentek (2014). The effects of different thermal treatments and organic acid levels in feed on microbial composition and activity in gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science* **93**(6): S. 1440-1452.
- Gorinstein, S., M. Zemser, R. Haruenkit, R. Chuthakorn, F. Grauer, O. Martin-Belloso and S. Trakhtenberg (1999). Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **10**(6): S. 367-371.
- Guzmán, O., C. Lemus, J. Bugarin, J. Bonilla and J. Ly (2013). Composition and chemical characteristics of mangoes (*Mangifera indica* L.) for animal feeding in Nayarit, Mexico *Cuban Journal of Agricultural Science* **47**(3) S. 273-277.
- Hagerman, A. E. (1992). Tannin-protein interactions. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I, American Chemical Society, Miami, USA, Vol. 506, S.236-247.
- Holt, R., S. Lazarus, M. Sullards, Q. Zhu, D. Schramm and J. Hammerstone (2002). Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4s-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of flavanol-rich cocoa. *The American journal of clinical nutrition* **76**(4): S. 798-804.
- Hungate, R. E. (1950). The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriology Reviews* **14**(1): S. 1 - 49.
- IUCN (1998). *Mangifera indica* L.. The IUCN Red List of Threatened Species, Internetquelle, abgerufen am 20.05.2012, <http://www.iucnredlist.org/details/31389/0>.
- Jimenez-Moreno, E., J. M. Gonzalez-Alvarado, A. Gonzalez-Serrano, R. Lazaro and G. G. Mateos (2009). Effect of dietary fiber and fat on performance and digestive traits of broilers from one to twenty-one days of age. *Poultry Science* **88**(12): S. 2562-2574.
- Jorgensen, H., X. Q. Zhao, K. E. Knudsen and B. O. Eggum (1996). The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *The British Journal of Nutrition* **75**(3): S. 379-395.
- Joseph, J. K. and J. Abolaji (1997). Effects of replacing maize with graded levels of cooked Nigerian mango-seed kernels (*Mangifera indica*) on the performance, carcass yield and meat quality of broiler chickens. *Bioresource Technology* **61**(1): S. 99-102.
- Józefiak, D., A. Rutkowski, B. B. Jensen and R. M. Engberg (2006). The effect of β -glucanase supplementation of barley- and oat-based diets on growth performance and fermentation in broiler chicken gastrointestinal tract. *British Poultry Science* **47**(1): S. 57-64.
- Kabuki, T., H. Nakajima, M. Arai, S. Ueda, Y. Kuwabara and S. Dosako (2000a). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chemistry* **71**(1): S. 61-66.
- Kamphues, J., M. Coenen and E. Kienzle (2014). Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung, M. & H.Schaper GmbH, Hannover, Deutschland, 12. Auflage.

- Ketsa, S., S. Chidtragool, J. D. Klein and S. Lurie (1998). Effect of heat treatment on changes in softening, pectic substances and activities of polygalacturonase, pectinesterase and β -galactosidase of ripening mango. *Journal of Plant Physiology* **153**(3): S. 457-461.
- Kim, M. S., S. B. Park, K. Suk, I. K. Kim, S. Y. Kim, J. A. Kim, S. H. Lee, S. H. Kim, S. H. Lee and S. H. Kim (2009). Gallotannin isolated from Euphorbia species, 1,2,6-tri-O-galloyl-beta-D-allose, decreases nitric oxide production through inhibition of nuclear factor-kappa>B and downstream inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **32**(6): S. 1053-1056.
- Kluth, H., K. Mehlhorn and M. Rodehutschord (2005). Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. *Archiv für Tierernährung* **59**(4): S. 271-279.
- Knödler, M., N. Berardini, D. R. Kammerer, R. Carle and A. Schieber (2007). Characterization of major and minor alk(en)ylresorcinols from mango (*Mangifera indica* L.) peels by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**(6): S. 945-951.
- König, H. E., G. G. Liebich and H. Bragulla (2001). Anatomie und Propädeutik des Geflügels: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Schattauer, F.K. Verlag, Stuttgart, Deutschland, S.92-96.
- Kratchanova, M., C. Bénémou and C. Kratchanov (1991). On the Pectic Substances of Mango Fruits. *Carbohydrate Polymers* **15**(3): S. 271-282.
- Kröger, S. (2009). Untersuchungen zur Bildung von Vitamin K2 durch die Intestinalflora des Hundes. Dissertation. Freie Universität Berlin, Deutschland.
- Langhout, D. J. and J. B. Schutte (1996). Nutritional implications of pectins in chicks in relation to esterification and origin of pectins. *Poultry Science* **75**(10): S. 1236-1242.
- Langhout, D. J., J. B. Schutte, P. Van Leeuwen, J. Wiebenga and S. Tamminga (1999). Effect of dietary high- and low-methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestinal wall of broiler chicks. *British Poultry Science* **40**(3): S. 340-347.
- Larrauri, J. A., P. Rupérez, B. Borroto and F. Saura-Calixto (1996). Mango peels as a new tropical fibre: Preparation and characterization. *LWT- Food Science and Technology* **29**(8): S. 729-733.
- Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer and M. D. Lee (2003). Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11): S. 6816-6824.
- Macfarlane, G. T., G. R. Gibson, E. Beatty and J. H. Cummings (1992). Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. *FEMS Microbiology Letters* **101**(2): S. 81-88.
- Macfarlane, S. and G. T. Macfarlane (1995). Proteolysis and amino acid fermentation. *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p. 75.
- Martínez, G., R. Delgado, G. Pérez, G. Garrido, A. J. Núñez Sellés and O. S. León (2000). Evaluation of the in-vitro antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytotherapy Research* **14**(6): S. 424-427.

- Masibo, M. and Q. He (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **7**(4): S. 309-319.
- Mateos, G. G., E. Jiménez-Moreno, M. P. Serrano and R. P. Lázaro (2012). Poultry response to high levels of dietary fiber sources varying in physical and chemical characteristics. *The Journal of Applied Poultry Research* **21**(1): S. 156-174.
- Matern, U. and B. Grimmig (1993). Polyphenols in plant pathology. *Polyphenolic Phenomena*, INRA Editions, Paris, France, S. 143-147.
- May, C. D. (1990). Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers* **12**(1): S. 79-99.
- Meimandipour, A., M. Shuhaimi, M. Hair-Bejo, K. Azhar, B. M. Kabeir, B. Rasti and A. M. Yazid (2009). In-vitro fermentation of broiler cecal content: The role of lactobacilli and pH value on the composition of microbiota and end products fermentation. *Letters in Applied Microbiology* **49**(4): S. 415-420.
- Mitrovic, S., V. Dermanovic, M. Radivojevic, Z. Rajic, D. Živkovi, D. Ostojic and N. Filipovic (2010). The influence of population density and duration of breeding on broiler chickens productivity and profitability. *African Journal of Biotechnology* **9**(28): S. 4486-4490.
- Mohamed, M. A., M. A. Shehata and E. Rafeek (2014). Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from broiler chickens. *Veterinary medicine international* **2014**(1): S. 1-6.
- Mroz, Z., S. J. Koopmans, A. Bannink, K. Partanen, W. Krasucki, M. Øverland and S. Radcliffe (2006). Carboxylic acids as bioregulators and gut growth promoters in nonruminants. *Biology of Growing Animals*. Elsevier GmbH, München, Deutschland, Volume 4 , S. 81-133.
- Muruganandan, S., J. Lal and P. K. Gupta (2005b). Immunotherapeutic effects of mangiferin mediated by the inhibition of oxidative stress to activated lymphocytes, neutrophils and macrophages. *Toxicology* **215**(1-2): S. 57-68.
- Odunsi, A. A. (2005). Response of laying hens and growing broilers to the dietary inclusion of mango (*Mangifera indica* L.) seed kernel meal. *Tropical Animal Health and Production* **37**(2): S. 139-150.
- Ortega, N., J. Reguant, M.-P. Romero, A. Macià and M.-J. Motilva (2009). Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an In-vitro-digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(13): S. 5743-5749.
- Pirt, S.J. (1975) *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific Publications Ltd., London, United Kingdom
- Peter, M. and J. Seibel (2015). Pektine. RÖMPP, Georg Thieme Verlag KG., Internetquelle, abgerufen am 16.12.2015, Stuttgart, Deutschland.
- Pusztai, A. (1991). *Plant lectins*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom, p. 272.
- Ramirez, J. E., R. Zambrano, B. Sepulveda and M. J. Simirgiotis (2013). Antioxidant properties and hyphenated HPLC-PDA-MS profiling of Chilean Pica mango fruits (*Mangifera indica* L. Cv. Piqueno). *Molecules* **19**(1): S. 438-458.

- Ranjitkar, S., B. Lawley, G. Tannock and R. M. Engberg (2016). Bacterial succession in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* **82**(8): S. 2399-2410.
- Ravindran, V. and R. Sivakanesan (1995). Breadfruit (*Artocarpus communis*) meal nutrient composition and feeding value for broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **69**(3): S. 379 - 383.
- Ravindran, V. and R. Sivakanesan (1996). The nutritive value of mango seed kernels for starting chicks. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **71**(2): S. 245-250.
- Rehman, H. U., W. Vahjen, W. A. Awad and J. Zentek (2007). Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Archiv für Tierernährung* **61**(5): S. 319-335.
- Ribeiro, S. M. R., L. C. A. Barbosa, J. H. Queiroz, M. Knödler and A. Schieber (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry* **110**(3): S. 620-623.
- Ricke, S. C., P. J. Van Der Aar, G. C. Fahey and L. L. Berger (1982). Influence of dietary fibers on performance and fermentation characteristics of gut contents from growing chicks. *Poultry Science* **61**(7): S. 1335-1343.
- Rivera, D. G., I. Hernandez, N. Merino, Y. Luque, A. Alvarez, Y. Martin, A. Amador, L. Nuevas and R. Delgado (2011). *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin reduce the airway inflammation and Th2 cytokines in murine model of allergic asthma. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **63**(10): S. 1336-1345.
- Robards, K., P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang and W. Glover (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**(4): S. 401-436.
- Romruen, K., W. Drochner, H. Lüders and K. D. Günther (1988). Auswirkungen steigender Pektingaben an Legehennen auf Futterverträglichkeit, Verdaulichkeit der Nährstoffe und einige Parameter im Darmchymus und Serum, geprüft im "Pair-Feeding-Verfahren". *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **60**(1-5): S. 257-268.
- Rubinelli, P., S. Roto, S. A. Kim, S. H. Park, H. O. Pavlidis, D. McIntyre and S. C. Ricke (2016). Reduction of *Salmonella typhimurium* by fermentation metabolites of diamond V original XPC in an in-vitro anaerobic mixed chicken cecal culture. *Frontiers in veterinary science* **3**(1): S. 83-90.
- Rudolph, B., K. M. Gebendorfer, J. Buchner and J. Winter (2010). Evolution of *Escherichia coli* for growth at high temperatures. *Journal of Biological Chemistry* **285**(25): S. 19029-19034.
- Ruhnke, I., I. Rohe, C. Kramer, F. Goodarzi Borojani, F. Knorr, A. Mader, E. Schulze, A. Hafeez, K. Neumann, R. Lowe and J. Zentek (2015). The effects of particle size, milling method, and thermal treatment of feed on performance, apparent ileal digestibility, and pH of the digesta in laying hens. *Poultry Science* **94**(4): S. 692-699.
- Saleh, N. A. M. and M. A. I. El-Ansari (1975). Polyphenolics of twenty local varieties of *Mangifera indica*. *Planta Medica* **28**(2): S. 124-130.
- Sánchez, G. M., L. Re, A. Giuliani, A. J. Núñez-Sellés, G. P. Davison and O. S. León-Fernández (2000). Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacological Research* **42**(6): S. 565-573.

Sanon, H. and A. Kanwe (2010) Valorisation of mango peels and seed kernels in animal feeding: Nutritive value and voluntary feed intake by sheep. *Advances in Animal Bioscience* **1**, 445-446. Internetquelle, abgerufen am 26.07.2015, https://www.researchgate.net/publication/259403008_Valorisation_of_mango_peels_and_seed_kernels_in_animal_feeding_Nutritive_value_and_voluntary_feed_intake_by_sheep.

Schieber, A., N. Berardini and R. Carle (2003b). Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(17): S. 5006-5011.

Schieber, A., P. Hilt, P. Streker, H.-U. Endreß, C. Rentschler and R. Carle (2003 a). A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Inovative Food Science & Emerging Technologies* **4**(1): S. 99-107.

Schurz, M. (1997). Zum Einsatz von Enzymen in der Tierhaltung - Handbuch der tierischen Veredlung. Kamlage Verlag, Osnabrück, Deutschland.

Silva, S. S. and R. R. Smithard (2002). Effect of enzyme supplementation of a rye-based diet on xylanase activity in the small intestine of broilers, on intestinal crypt cell proliferation and on nutrient digestibility and growth performance of the birds. *British Poultry Science* **43**(2): S. 274-282.

Singh, S. K., Y. Kumar, S. S. Kumar, V. K. Sharma, K. Dua and A. Samad (2009). Antimicrobial evaluation of mangiferin analogues. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **71**(3): S. 328-331.

Sirisakulwat, S., A. Nagel, P. Sruamsiri, R. Carle and S. Neidhart (2008). Yield and quality of pectins extractable from the peels of thai mango cultivars depending on fruit ripeness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(22): S. 10727-10738.

Sokurenko, E. V., V. A. McMackin and D. L. Hasty (1995). Bacterial adhesion measured by growth of adherent organisms. *Methods in enzymology* **253**(41): S. 519-528.

Souci, S. W., W. Fachmann and H. Kraut (2017). Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Internetquelle:, abgerufen am 12.01.2017, <https://www.sfk.online/search>

Spencer, J., H. Schroeter, B. Shenoy, S. Kaila, S. Srail, E. Debnam and C. Rice-Evans (2001). Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **285**(3): S. 588-593.

Srirangarajan, A. N. and A. J. Shrikhande (1977). Characterisation of mango peel pectin. *Journal of Food Science and Technology* **42**(1): S. 279-280.

Srirangarajan, A. N. and A. J. Shrikhande (1979). Technical note: Comparative aspects of pectin extracted from the peels of different varieties of mango. *International Journal of Food Science & Technology* **14**(5): S. 539-541.

Sruamsiri, S. and P. Silman (2009). Nutritive value and nutrient digestibility of ensiled mango by-products. *Maejo International Journal of Science and Technology* **3**(3): S. 371-378.

Statista (2016). Import von frischen Mangofrüchten, Mangostanfrüchten und Guaven nach Deutschland in den Jahren 2011 bis 2015 (in 1.000 Tonnen). Internetquelle, aberufen am 16.12.2016, <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/581654/umfrage/importmenge-von-mangos-nach-deutschland/>

- Stoilova, I., S. Gargova, A. Stoyanova and I. Ho (2005). Antimicrobial and antioxydant activity of the polyphenol mangiferin. *Herba polonica Journal* **51**(1): S. 37-44.
- Taylor, R. D. and G. P. Jones (2004). The incorporation of whole grain into pelleted broiler chicken diets. II. Gastrointestinal and digesta characteristics. *British Poultry Science* **45**(2): S. 237-246.
- Tegua, A. (1995). Substituting ground mango kernels (*Mangifera indica L*) for maize in broiler starter diets. *Animal Feed Science and Technology* **56**(1-2): S. 155-158.
- Terada, A., H. Hara, S. Nakajyo, H. Ichikawa, Y. Hara, K. Fukai, Y. Kobayashi and T. Mitsuoka (1993). Effect of supplements of tea polyphenols on the caecal flora and caecal metabolites of chicks. *Microbial Ecology in Health and Disease* **6**(1): S. 3-9.
- Terada, A., H. Hara, J. Sakamoto, N. Sato, S. Takagi, T. Mitsuoka, R. Mino, K. Hara, I. Fujimori and T. Yamada (1994). Effects of dietary supplementation with lactosucrose (4G- β -D-Galactosylsucrose) on cecal flora, cecal metabolites and performance in broiler chickens. *Poultry Science* **73**(11): S. 1663-1672.
- Thomas, D. G., V. Ravindran, D. V. Thomas, B. J. Camden, Y. H. Cottam, P. C. H. Morel and C. J. Cook (2004). Influence of stocking density on the performance, carcass characteristics and selected welfare indicators of broiler chickens. *New Zealand Veterinary Journal* **52**(2): S. 76-81.
- Tyohemba Orayaga, K., O. Atanda Oluremi, C. Dooshima Tuleun and S. Ngbede Carew (2015). The feed value of composite mango (*Mangifera indica*) fruit reject meal in the finisher broiler chickens nutrition, *African Journal of Food Science and Technology* **6**(6): S. 177 - 184.
- Vodde, H. (2014). Einfluss eines Hefezellwandproduktes auf die zootechnische Leistung sowie verdauungsphysiologische, mikrobiologische und immunologische Parameter bei Masthühnern. Dissertation. Freie Universität Berlin, Deutschland.
- Wagner, D. D. and O. P. Thomas (1978). Influence of diets containing rye or pectin on the intestinal flora of chicks. *Poultry Science* **57**(4): S. 971-975.
- Wang, S., J. Wang, H. Mou, B. Luo and X. Jiang (2015). Inhibition of adhesion of intestinal pathogens (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella Typhimurium*) by common oligosaccharides. *Foodborne pathogens and disease* **12**(4): S. 360-365.
- Wijemanne, P. and R. A. Moxley (2014). Glucose significantly enhances enterotoxigenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells through its effects on heat-labile enterotoxin production. *Public Library of Science* **9**(11): S. 1-10.
- Zander, R., M. Matthey, A. Hennig and I. Voigt (1988). The influence of different fiber types on the fecal nitrogen excretion and the content of volatile fatty acids in the feces of broiler hen breeds. *Archiv für Tierernährung* **38**(10): S. 893-903.
- Zia-ur-Rehman, S. Ali, K. A. D. and F. H. Shah (1994). Utilisation of fruit and vegetable wastes in layers' diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **65**(4): S. 381-383.

Anhang

A.1. Herstellung von Arbeitslösungen für die Charakterisierung einer präbiotischen Wirkung mittels semi-kontinuierlichem Fermentationssystem

A.1.1. PRAS-Puffer (Prereduced Anaerobe Sterilized Medium)

Der PRAS-Puffer wurde in einer 1 l Schottflasche (SCHOTT AG, Mainz, Deutschland) auf einem Magnetrührer (IKA-RH-HAT/C, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) hergestellt, die Rezeptur ist in Tabelle 21 dargestellt:

Tab.21: Zusammensetzung des PRAS-Puffers

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

Quelle: (Kröger 2009)

A.1.2. Herstellung der Arbeitslösungen für die Ammoniummessung

100 mM MOPS– Lösung (pH 7):

Insgesamt 2,0928 g MOPS (3 – (N – Morpholino) – 2hydroxypropansulfonsäure ≥ 99 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland, Karlsruhe) wurden in ein 100 ml Becherglas gegeben, in 80 ml *Aqua bidest.* gelöst und bei 4°C auf pH 7 eingestellt mit verdünnter Schwefelsäure (Schwefelsäure, w = 95-97 %, J.T. Baker, Deventer, Niederlande) und Natronlauge (NaOH, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland, Karlsruhe), nachfolgend wurde der Ansatz auf 100 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

Phenolnitroprussid, Reagenz 1:

Es wurde eine kommerzielle Lösung verwendet (Phenolnitroprusside, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

0,2 % Na-Hypochloritlösung, Reagenz-II:

Es wurden 59 ml NaOH-Lösung (1 M) (NaOH, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland, Karlsruhe) mit 1 ml Na-Hypochlorit-Lösung (Na-Hypochlorit, 12 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland, Karlsruhe) gemischt und bis zur Verwendung bei 4°C gekühlt (Kühlschrank Liebherr Profiline, LIEBHERR, Biberach an der Riß, Deutschland).

NH₄⁺ Standardherstellung:

Aus einer Stammlösung (1000 mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl ≥99,5 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurde eine Arbeitslösung mit 1000 µM NH₄Cl hergestellt. Diese diente als Ausgangslösung für die Herstellung der Kalibrierstandards. Die Proben wurden nach 15 min Auftauen bei Raumtemperatur in Eiswasser gestellt. Nachdem der Auftauvorgang abgeschlossen war, wurden sie 1 min homogenisiert, 10 min auf Eis inkubiert und dann bei 17000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf 5430, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde im Verhältnis von 1:25 mit MOPS-Puffer in einer Mikrotiterplatte (ELISA plate Microton U-shape, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) auf einem Rüttler (BiosShake iQ, Analytic Jena AG, Jena, Deutschland) mit 1050 x g gemischt.

A.1.3. Kurzkettige Fettsäuren - Herstellung der Lösungen

Interne Standardlösung:

Für die Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wurde zunächst eine Verdünnung der Stammlösung („Volatile Acid Standard Mix“ 10 mmol/l, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) im Verhältnis 1:20 durchgeführt. Hierfür wurden 50 µl Stammlösung in ein Vial mit 10 mg Oxalsäure-Dihydrat und 950 µl *Aqua bidest.* gemischt. Für die Sicherstellung, dass die Proben korrekt gemessen wurden, wurde eine Mischung mit einer Probenverdünnungslösung hergestellt. Diese enthielt eine im Darm nicht vorkommende flüchtige Fettsäure (Capronsäure). Die Herstellung ist nachfolgend dargestellt:

Probenverdünnungslösung (ISTD 0.5 mmol/l):

Die Stammlösung wurde im Verhältnis 1: 20 verdünnt: Zu 50 ml Stammlösung wurden 2,5 g Natriumazid (Natriumazid reinst, Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland) und 10 g Oxalsäure-Dihydrat hinzugegeben und auf 1000 ml im Messkolben aufgefüllt. ISTD enthielt unter

anderem Natriumazid zur Abtötung der Bakterien und um die weitere Produktion von Fettsäuren zu stoppen.

A.2. Herstellung der Lösungen und verwendete Bakterienstämme für die Charakterisierung von Adhäsionseffekten pflanzlicher Extrakte auf ausgewählte aviäre *E. coli*

A.2.1. verwendete Bakterienstämme von *E. coli*

Die Bakterienstämme stammten aus der Sammlung von Institut für Tierseuchen der Freien Universität Berlin. Ihre genaue Spezifikation ist nachfolgend in Tabelle 22 dargestellt:

Tab. 22: Verwendete Bakterienkulturen/Stämme von *E. coli* und Eigenschaften

Bezeichnung	Name	Inkubation	Herkunfts- Bezeichnung	Serovar	Isolation aus	Virulenzmerkmale
IMT 15146	Kommensale Broiler	aerob 37°C	2.1b März 08 Nr.212	Unbekannt	Kloaken -tupfer	Unbekannt
IMT 2271	APEC Broiler	aerob 37°C	K0274/99	O1:O2:O78	Leber	Unbekannt
IMT 9241	APEC Broiler	aerob 37°C	B 1838	Unbekannt	Tupfer	Unbekannt
IMT 2358	APEC Broiler	aerob 37°C	415/98	O78:K80	Leber	astA -, FyuA +, irp2 +, aer +, tsh +, fimC +, papC +, hlyE -, stx2f -
IMT 11863	APEC Broiler	aerob 37°C	IMT 308/06 G20	Unbekannt	Keim- isolat	Unbekannt

A.2.2. Herstellung der Arbeitslösungen für den Adhäsionsversuch

PBS (Verdünnungslösung für die Substanzen)

PBS (Phosphate Buffer Saline PBS Dulbecco, low endotoxin, 9,55 g/l, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) wurde mit 9,55 g/l in eine bereits mit 950 ml *Aqua bidest.* gefüllte Schottflasche (SCHOTT AG, Mainz, Deutschland) eingewogen und mittels Rührfischchen auf einem Magnetrührer (IKA-RH-HAT/C, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) gemischt. In einem Messzylinder wurde die Lösung auf 1 l mit *Aqua bidest.* aufgefüllt und danach in eine Schottflasche gefüllt und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert (Laboklav, SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, Deutschland). Die Lösung wurde bis zum

Verarbeitungstag bei 4°C gelagert. Zur Verwendung der Lösung wurde diese zuvor auf Raumtemperatur gebracht.

Herstellung der Substanzlösungen

Zur Herstellung der 1 %-igen Substanzlösungen (eingesetzte Substanzen wie unter 3.1.1.: Apfelpektin, Mangopektin, Glukose, Polyphenole und Mangoschale (*Mangifera indica* L. var. Kesari) war es notwendig, jeweils 15 sterile Glasperlen pro 50 ml Zentrifugengefäß (Greiner Röhrchen 50 ml, CELLSTAR®PP test tubes, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) in die PBS-Lösungen zu geben und diese im Schüttelapparat (Multireax, Heidolph-Instruments GmbH & Co., Schwabach, Deutschland) für 4x20 min in Kombination mit manueller Behandlung wie in 3.1.1. zu lösen. Um die Lösungen mit dem Apfel- und Mangopektin herzustellen, wurden die Substanzgemische jeweils nach 20 min im Schüttler 3x in einem Ultraschallbad (Sonorex Typ RK 106, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) für jeweils 15 min behandelt. Nach Herstellung der 1 %-igen Lösungen wurden diese mit einem 0,45 µm Sterilfilter (Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und im Anschluss mit einem 0,2 µm Sterilfilter Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) filtriert. Bei den hergestellten Pektinlösungen wurden die Sterilfilter ausgetauscht, wenn eine Filtrierung aufgrund der Verlegung des Filters nicht mehr möglich war. Hierbei sind Änderungen der Farben der Lösung von Mango-Polyphenolen von schwarz zu grau zu beobachten. Auch die anderen Lösungen wurden nach der Filtrierung etwas heller. Die einzelnen Greiner-Gefäße wurden bei 1600 x g für 5 min zentrifugiert (Heraeus MEGAFUGE 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) und der Überstand für die Beschichtung der Platten verwendet.

Herstellung der Stopplösung

Mit destilliertem Wasser und einem 1 %-igem Anteil bovines Albumin (BSA (Bovines Serum Albumin, >92 %), gefriergetrocknet, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 0,5 % Natriumazid (Natriumazid reinst, Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurde eine Stopplösung hergestellt.

A.3. Daten zur Vorbereitung, Abbruchkriterien und Aufstallung während der Tierversuche

A.3.1. Abbruchkriterien

Die Abbruchkriterien wurden gemäß den Empfehlungen des Arbeitskreises der Berliner Tierschutzbeauftragten anhand der Vorgaben von Anhang VIII 2010/63/EU i.V.m. § 31 Abs. 2 Satz 2 Nr. 2.b TierSchVersV erstellt (Tabellen 23 und 24).

Tab. 23: Abbruchkriterien Tierversuch – Teil 1

<u>Anweisungen:</u>	
A	Bei nur einem Symptom der Kategorie A: das Tier täglich (ggf. auch mehrmals) beobachten. Spätestens bei Kombination von zwei oder mehr Symptomen der Kategorie A muss das Tier dem Tierarzt oder dem Projektleiter vorgestellt werden.
B	Bei einem Symptom der Kategorie B: das Tier muss dem Tierarzt vorgestellt werden. Der Projektleiter muss informiert werden.
C	Unverzüglich schmerzlos töten!
Achten Sie auf folgende SYMPTOME und handeln Sie nach den ANWEISUNGEN:	
SYMPTOME	ANWEISUNGEN
1. Beim täglichen Blick in den Stall	
Tier isoliert sich	A
Struppiges Federkleid	A
Aufgetriebener Leib	A
Geringfügig verstärkte Atmung	A
Exkrememente abweichend in Menge, Farbe und Konsistenz (einzeln oder kombiniert)	A
Anhaltende Obstipation	A
Schmerz (Haltung gekrümmt oder Leib aufgezogen)	B
Eingesunkene, trübe Augen	B
Blässe (Augen, Haut)	B
Blut an Körperöffnungen, blutiger Kot	B
Deutlich verstärkte Atmung	B
Durchfall, wenn schwächend oder andauernd	B
Starke Verhaltensauffälligkeiten	B
Kopfschiefhaltung	B
Parese(n)	B

Paralysen, spätestens sobald die Gefahr besteht, dass die Tiere aus eigener Kraft Wasser und Futter nicht mehr erreichen	C
Beim Umsetzen oder Wiegen	
Verletzungen, Hautveränderungen	A
Tier vermeidet Bewegungen	A
Teilnahmslosigkeit	A
Ruhelosigkeit	A
Stereotype Bewegungen im Kreis (circling)	A
Stelzgang	A
Lokale Infektion(en)	B
Abszess(e)	B
Bauch hart oder gespannt	B
Dehydratation	B
Ödembildung	B
Automutilation	B
10 % Gewichtsdefizit verglichen mit gesunden Tieren des gleichen Stamms und Alters. *	B
Beim Wiegen zu erkennende antragsbezogene Symptome der Kategorie B: <ul style="list-style-type: none"> • Schmerzempfindlichkeit und Schwellung der Gliedmaßen-Gelenke • Veränderungen an der Gliedmaße • Sekretansammlungen 	B
20 % Gewichtsdefizit verglichen mit gesunden Tieren des gleichen Stamms und Alters. *	C
* Keine extra zu beantragende Gruppe, sondern eine im Verlauf des Versuchsvorhabens ohnehin genehmigte, vollkommen unbehandelte gesunde Kontrollgruppe, deren tägliche Gewichtsentwicklung zu protokollieren ist.	
Hinweis:	

Die im Antrag zugesicherten Abbruchszenarien stellen einen vertragsanalogen Genehmigungsbestandteil dar, d.h. der Antragsteller verpflichtet sich zu der von ihm angegebenen Vorgehensweise und macht sich bei abweichendem Verhalten einer Ordnungswidrigkeit schuldig.

Vorzeitige Tötung leidender Tiere: steht versuchsbedingt nicht zu erwarten. Falls erforderlich, werden die Tiere nach Betäubung durch Schlag auf den Hinterkopf unter Blutentzug geschlachtet.

Tab. 24: Liste mit Abbruchkriterien (gemäß Arbeitskreis Tierschutzbeauftragter) - Teil 2

Bewertungsparameter	Kriterien	Scoring
Konsistenz der Exkrememente	flüssig, Diarrhöe	1
	Mischung aus größtem Anteil flüssiger Faeces	2
	geformte Faeces, aber sehr weich	3
	geformte und trockene Faeces, aber nicht hart	4
	geformte, trockene, harte Faeces	5
Abbruchkriterium:		
Score 1 sollte nicht erreicht werden		
Körperhaltung	aufrecht, belastet die Gliedmaßen gleichmäßig	1
	Unphysiologisch (mit Beschreibung)	2
Abbruchkriterium:		
Score 2 sollte nicht erreicht werden		
Verhalten	Apathisch	1
	Matt	2
	ruhig und aufmerksam	3
	Übererregt	4
	Exzitationen	5
Abbruchkriterium:		
Score 1 und 5 sollte nicht erreicht werden		
Ernährungszustand	sehr gut (adipös)	1
	Gut	2
	Mäßig	3
	Schlecht	4
	sehr schlecht (kachektisch)	5
Abbruchkriterium:		

Score 4 und 5 sollte nicht erreicht werden

Entwicklungszustand	Kümmerer	1
	Alter und Rasse entsprechend	2
	für Alter und Rasse überentwickelt	3

Abbruchkriterium:

Score 1 sollte nicht erreicht werden

Pflegezustand	Federn: Glatt, anliegend	1
	Haut: glatt, leicht glänzend, blassrosa, ohne Auflagerungen und Effloreszenzen	
	Federn: glatt, anliegend, stumpf, ggr. versehrt (Scheuerstellen), ggr. Federnausfall, ggr. Verfärbung	2
	Haut: ggr. rau, stumpf, blassrosa, ggr. Auflagerungen bzw. Effloreszenzen	
	Federn: struppig, stumpf, mgr. bis hgr. versehrt, großflächiger Ausfall	3
	Haut: starke Farbabweichungen, starke Auflagerungen bzw. Effloreszenzen	

Abbruchkriterium:

Score 3 sollte nicht erreicht werden

Allgemeinbefinden	Ungestört	1
	geringgradig gestört	2
	mittelgradig gestört	3
	hochgradig gestört	4

Abbruchkriterium:

Score 3 und 4 sollte nicht erreicht werden

A.4. Versuchsprotokoll Tierversuch

Gemäß den Vorschriften des Landesamts für Gesundheit und Soziales ist nachfolgend das Versuchsprotokoll aus dem Tierversuchgenehmigungsantrag dargestellt (Tabelle 25)

Tab. 25: Versuchsprotokoll, Anlage zum Genehmigungsantrag des Tierversuchs

Bezeichnung des Versuchsvorhabens:	VORGENOMMENE EINGRIFFE ODER BEHANDLUNGEN		ERWARTETE BELASTUNG								
	Ohne Betäubung	mit	Grad		Dauer in Tagen						
	100 %	mehrfach am gleichen Tier	keine	gering	mäßig	erheblich	< 1	1 - 7	7 - 30	> 30	
1. Applikation/Punktion ohne Erzielen von Krankheitszuständen	100 %	Fütterung	100 %								
2. Infektionsversuche											
3. Operative Eingriffe unter Narkose ohne Wiedererwachen											
4. Andere operative Eingriffe											
4.1 Bauch/Brusthöhle (2)											
4.2 Bewegungsapparat											
4.3 ZNS/Sinnesorgane (Auge, Nase, Ohr) (2)											
4.4 andere (3)											
5. Physikalische Einwirkungen mit/ohne Schleimhautschäden											
5.1 Bestrahlungen											
5.2 Elektroschocks											
5.3 Verbrennung											
5.4 andere (3)											
6. Schmerzreizung											
7. Toxizitätsuntersuchungen											
7.1 akut											
7.2 subakut											
7.3 chronisch											
8. Verhaltensbeeinträchtigungen											
8.1 aversives Lernen											
8.2 Deprivationen											
8.2.1 Sozial											
8.2.2 Schlaf											
8.2.3 Wasser											
8.2.4 Futter											
8.2.5 Bewegung											
8.3 Überreizung (Stress)											
8.4 andere (3)											
9. andere Eingriffe/Behandlungen (3)											

A.4.1. Aufstallung Tiergruppen

Eine fünfte Reihe von vier Boxen war auf der rechten Seite vorhanden, auf die Darstellung wurde verzichtet.

BOX 5	BOX 6
E1	A2
BOX 4	BOX 7
D1	B2
BOX 3	BOX 8
C1	C2
BOX 2	BOX 9
B1	D2
BOX 1	BOX 10
A1	E2

Tür

BOX 15	BOX 20
E3	A4
BOX 14	BOX 19
D3	B4
BOX 13	BOX 18
C3	C4
BOX 12	BOX 17
B3	D4
BOX 11	BOX 16
A3	E4

*1 je 8 Tiere pro Versuchseinheit

Abb. 6: Randomisierte Aufstallung der fünf Fütterungsgruppen - Durchgang 1*

BOX 5	BOX 6		BOX 15	BOX 20
A1	C2		C3	D4
BOX 4	BOX 7		BOX 14	BOX 19
E1	D2		B3	C4
BOX 3	BOX 8		BOX 13	BOX 18
D1	E2		A3	B4
BOX 2	BOX 9		BOX 12	BOX 17
C1	A2		E3	A4
BOX 1	BOX 10	Tür	BOX 11	BOX 16
B1	B2		D3	E4

*27-8 Tiere/ Versuchseinheit

Abb. 7: Randomisierte Aufstallung der fünf Fütterungsgruppen - Durchgang 2*2

A.4.2. Ergebnisse der Weender Analyse der Mangoschalen

Die Ergebnisse der Rohmaterialanalysen der Mangoschalenvarianten sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tab. 26: Ergebnisse der Analysen des Ausgangsmaterials

Probe	Einheit	MS	Dep.MS
Ts		946	977
Rohasche		58,2	29,2
Rohprotein		67,6	159
Rohfett		31,2	89,0
Rohfaser	g/kg Lyophilisat	160	581
Phosphor		1,30	0,97
Ca		4,62	1,64
Na		0,34	1,33
K		13,5	0,46
Mg		1910	148
Fe		761	1031
Mn	mg/kg Lyophilisat	37,1	13,9
Cu		8,93	13,8
Zn		12,0	21,4
Taurin		0,14	0,16
Asparaginsäure		0,50	1,15
Threonin		0,25	0,60
Serin		0,30	0,68
Glutaminsäure		0,51	1,04
Glycin		0,30	0,62
Alanin		0,33	0,71
Valin		0,33	0,72
Isoleucin		0,26	0,58
Leucin		0,43	0,98
Tyrosin		0,16	0,41
Phenylalanin	g/100 g	0,26	0,62
GaBa		0,00	0,05
Histidin		0,17	0,41
Ornithin		0,00	0,01
Lysin		0,24	0,67
Arginin		0,25	0,59
Prolin		0,26	0,62
Methionin		0,12	0,31
Cystein		0,13	0,30
Gesamtaminosäuren		4,93	11,2
Rohprotein		6,76	15,9
Gesamtzucker		13,4	<0, 5

MS=Mangoschale; Dep.MS=Depektinisierte Mangoschale

*Analyse von AIS, TS, Pektingehalt, Galacturonsäuregehalt zur Qualitätskontrolle

AIS = Alkoholunlösliche Substanz, TS=Trockensubstanz

A.4.3. Schwermetall- und Pestizidanalysen

Residuale + Schwermetalle

SGS INSTITUT FRESENIUS GmbH Tegeler Weg 33 10589 Berlin

Herbstreith & Fox KG
Pektin-Fabrik Neuenbürg
Turmstr. 37
75305 Neuenbürg

Prüfbericht 1866812
Auftrags Nr. 2712290
Kunden Nr. 4606700



Consumer Testing Services
Food & Beverages
SGS INSTITUT FRESENIUS GmbH
Tegeler Weg 33
10589 Berlin

Berlin, den 09.09.2013

Ihr Auftrag/Projekt: .
Ihre Bestellnummer: Analytic
Ihr Bestelldatum: 27.08.2013

SGS INSTITUT FRESENIUS

i.V.

[Redacted]
Dipl. Ing. Lebensmitteltechnologie
Analytic Consultant Food

i.V.

[Redacted]
staatl. geprüfte Lebensmittelchemikerin
Analytic Consultant Food

Seite 1 von 3

SGS INSTITUT FRESENIUS GmbH | Im Maisel 14 D-65232 Taunusstein t +49 6128 744-0 f +49 6128 744-9890 www.institut-fresenius.de
Geschäftsführer: Vincent Giesus Furnari; Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Hellemans, Sitz der Gesellschaft: Taunusstein
HRB 21543 Amtsgericht Wiesbaden

Die Prüfergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Proben. Die Veröffentlichung und Vervielfältigung unserer Prüfberichte und Gutachten zu Werbezwecken sowie deren auszugsweise Verwendung in sonstigen Fällen bedürfen unserer schriftlichen Genehmigung. Alle Dienstleistungen werden auf Grundlage der anwendbaren Allgemeinen Geschäftsbedingungen der SGS, die auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden, erbracht.
Member of the SGS Group (Société Générale de Surveillance)

Allgemeine Angaben:

Proben-Nr.:	130765155
Probe:	Pulverisierte Mangoschale
Probeneingangsdatum:	02.09.2013
Untersuchungsbeginn / -ende:	02.09.2013 / 06.09.2013

Untersuchungsergebnisse:

Parameter	Methode	Lab	Einheit	Ergebnis	Bestimmungsgrenze	Anforderung
Mineralstoffe/Metalle/Anionen:						
Blei	DIN EN 15763 mod., SOP M 1474, ICP/MS	HH	mg/kg	0,42	0,02	
Cadmium	DIN EN 15763 mod., SOP M 1474, ICP/MS	HH	mg/kg	0,02	0,01	
Quecksilber	SOP M 2567, Feststoffanalysator ⁽¹⁾	HH	mg/kg	< 0,01	0,01	
Arsen	DIN EN 15763 mod., SOP M 1474, ICP/MS	HH	mg/kg	0,05	0,04	
Kupfer	DIN EN 15763 mod., SOP M 1474, ICP/MS	HH	mg/kg	9,51	0,20	
Zink	DIN EN 15763 mod., SOP M 1474, ICP/MS	HH	mg/kg	14,0	2,00	
Zinn	DIN EN 15763 mod., SOP M 1474, ICP/MS	HH	mg/kg	< 0,10	0,10	

(1) In Anlehnung an die Richtlinie zur chemischen Analyse des
Fraunhofer-Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie
(Umwelt-Bundes-Amt)

Parameter	Methode	Lab	Einheit	Ergebnis	Bestimmungsgrenze	Höchstgehalt
Pestizide - Multimethode:						
Carbendazim/Benomyl, insg. ber.	ASU L 00.00-115, LC	B2	mg/kg	0,027	0,005	0,5
Chlorpyrifos	ASU L 00.00-115, GC	B2	mg/kg	0,005	0,005	0,05
Untersuchungsspektrum	ASU L 00.00-115, LC bzw. ASU L 00.00-115, GC	B2	mg/kg	⁽¹⁾		

(1) Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze, sofern oben nicht aufgeführt
Spektrum: OGT - Complete 400

Pestizide - Carbamate:						
Untersuchungsspektrum	ASU L 00.00-115, LC	B2	mg/kg	⁽¹⁾	-	-

(1) Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze, sofern oben nicht aufgeführt
Spektrum: OGT - Complete 400

Ihr Auftrag/Projekt: .
Ihre Bestellnummer: Analytic

Prüfbericht Nr. 1866812
Auftrag 2712290 Probe 130765155

Seite 3 von 3
09.09.2013

Probe 130765155	Pulverisierte Mangoschale					
Parameter	Methode	Lab	Einheit	Ergebnis	Bestimmungsgrenze	Höchstgehalt

Pestizide - Dithiocarbamate:

Dithiocarbamate, ber. als CS2	ASU L 00.00-49/2, GC	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	2
-------------------------------	----------------------	----	-------	---------	-------	---

Pestizide - Dodin:

Dodin-Screening	ASU L 00.00-115, LC B2			negativ		-
-----------------	------------------------	--	--	---------	--	---

Beurteilung/Kommentar

In der vorliegenden Probe wurden Rückstände an den untersuchten Pestiziden nachgewiesen, welche die Höchstgehalte einhalten. Die Probe entspricht diesbezüglich der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in der aktuellen Version.

Die Höchstgehalte an Blei von 0,1 mg/kg (Frischgewicht; F=5) und Cadmium von 0,05 mg/kg werden eingehalten [Kontaminanten-Höchstgehaltesverordnung (EG) Nr. 1881/2006]. Quecksilber und Zinn waren in der Probe nicht nachweisbar.

Höchstgehalte gemäß der europäischen Regelung (VO EG Nr. 396/2005), EU-RHG-Ausnahmereverordnung, Zusatzstoff-ZulassungsVO, in der jeweils gültigen Version
V = EU-RHG-Ausnahmereverordnung; A = Allgemeine Höchstmenge; H = Höchstmenge gemäß RHmV; N = Neubewertung;
K = Korrektur; AE = Änderung;
Pestizid-Wirkstoffliste kann auf Anforderung zugeschickt werden

Die Laborstandorte der SGS Gruppe Deutschland und Schweiz gemäß den oben genannten Kürzeln sind aufgeführt unter <http://www.institut-fresenius.de/filestore/89/aborstandortkuerzelsgs2.pdf>.

A.4.4. Depektinisierungsvorgang

Insgesamt 50 kg der getrockneten Mangoschalen wurden für die Fütterung von depektinisierten Schalen zuvor noch durch den Projektpartner Herbstreith und Fox.KG in einem eigens dafür entwickelten Verfahren depektinisiert. Der Vorgang beruhte auf der enzymatischen Extraktion von Pektin mittels bakterieller Pektinasen bei einem eingestellten pH-Wert unter Einwirkung von verschiedenen Temperaturen. Die depektinisierten Schalen wurden nach der Extraktion gefroren und bei -20°C als Blöcke von 250 g übersandt. Zunächst wurde eine Charakterisierung des Mangoschalpulvers vorgenommen. Es wurden TS (trockensubstanz), pH, AIS (Alkoholunlösliche Substanz) bestimmt. Hiernach fand eine Wässerung von jeweils 2 kg MS-Pulver mit 30 l Wasser (85°C, pH 1,6) statt. Die pH-Einstellung erfolgte mit 53 %igen HNO₃. Im Anschluss wurde der pH auf 2,0-2,1 pH eingestellt bei 85°C. Das Gemisch wurde für 6 h bei 85°C inkubiert, danach wurde eine Dekantierung des flüssigen Überstandes durchgeführt (hierbei erfolgte eine Sedimentation der getrockneten MS). Zu zwei Teilen sedimentiertem Überstand wurde ein Teil Wasser gegeben. Die Temperatur des Ansatzes lag jetzt bei 45°C. Der pH-Wert wurde auf 4,5 mittels 50 %iger NaOH eingestellt. Es wurden 20 ml Enzym Pectinex 3XL hinzugegeben und eine homogene Verteilung durch Rühren herbeigeführt. Das Gemisch wurde für den Pektinabbau für 16 h bei 45°C inkubiert. Je 1,5 l Ansatz wurden mit der Hirmle-Durchlaufzentrifuge zentrifugiert und flüssiger Überstand dekantiert. Der gebildete Rückstand wurde mit 2 l Wasser klar gewaschen und nochmals zentrifugiert. Eine Analyse des Pulvers wurde auf Rückstände von Pektin zur Qualitätssicherung durchgeführt und der gebildete Rückstand bei -20°C weggefroren und an das Institut für Tierernährung zur weiteren Lyophilisierung übersandt. Die depektinisierten Schalen wurden im Institut für Tierernährung gefriergetrocknet und mit einer gegenüber den Spurenelementen neutralen Mühle gemahlen, um eine verarbeitungsfähige Materie für die Futtermischungen zu erhalten.

A.4.5. Oxidationslösung AS

Bestimmung von Methionin und Cystein: Herstellung der Oxidationslösung

Es wurden 0,5 ml Wasserstoffperoxid (30 %) mit 4,5 ml Essigsäure (88 %) vermischt und eine Stunde bei 30 °C in ein Wasserbad gestellt. Dann wurde die Lösung für 5 min in ein Eisbad gestellt und sofort verwendet.

A.4.6. Hydrolysenmischung AS

Hydrolysenmischung für die Aminosäurebestimmungen

Es wurden 492 ml Salzsäure (37 %) mit *Aqua bidest.* auf einen Liter vorsichtig aufgefüllt.

A.4.7. Herstellung des Citratpuffers für den Aminosäureaufschluss

Citratpuffer (0,2 mo l / L):

Es wurden 39,2 g Na- Citrat mit 2 ml Phenol, 32 ml Salzsäure (w= 37 %) und 1 ml Thiodiglycol vermischt und auf 2 l mit *Aqua bidest.* aufgefüllt

A.4.8. Herstellung der Lösungen für die Phosphatbestimmung

Ammoniummolybdat-Lösung (Lösung 1)

Es wurden 100 g Ammoniummolybdat in warmen *Aqua bidest.* gelöst und nach dem Abkühlen wurden 10 ml Ammoniak (w = 25 %) hinzugeben und die Lösung auf 1000 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

Ammoniummetavanadat-Lösung (Lösung 2)

Es wurden 2,35 g Ammoniummetavanadat in 400 ml *Aqua bidest.* gelöst und 7 ml Salpetersäure (w= 65 %) und 13 ml H₂O langsam hinzugegeben. Die Lösung wurde auf 1000 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

Nitrovanadatmolybdat-Lösung

Aus Lösung 1 und 2 wurde unter ständigem Rühren mittels Rührfischchen eine neue Lösung hergestellt. Hierfür wurden 200 ml Lösung 1 mit 200 ml Lösung 2 versetzt und langsam 134 ml Salpetersäure (w = 65 %) hinzugegeben und auf 1000 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

Kalibrierlösung 1 mg/ml

Für die Herstellung der Kalibrierlösung wurden 0,4387 g Monokaliumphosphat in *Aqua bidest.* gelöst und auf 100 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt. Für die Messung wurden hiervon eine 1:10 Verdünnung hergestellt.

A.4.9. Herstellung des Standards für die Titanbestimmung:

Es wurden 50 mg Titandioxid als Probe eingewogen und mit 25 ml *Aqua bidest.* aufgefüllt. Die Lösung enthielt eine Konzentration von 2 mg/ml. Zwei Milliliter hiervon wurden auf 10 ml *Aqua bidest.* gegeben, was eine Konzentration von 0,4 mg/ml ergab. Diese Konzentration wurde als Stammlösung betrachtet. Die Stammlösung wurde weiter verdünnt um eine Standardreihe von 500, 200, 100 und 50 µg/2,2 ml zu erhalten. Es wurde die doppelte Menge hergestellt um eine Doppelbestimmung durchzuführen. Die Verdünnung ist tabellarisch nachfolgend dargestellt (Tabelle 27).

Tab. 27: Pipettierschema Standardreihe für die Titanbestimmung

μl Stammlösung	μl Aqua bidest.	Endkonzentration TiO_2 (μg) in 2,2 ml
312,5	4687,5	50
625	4375	100
1250	3750	200
3125	1875	500

A.5. Herstellung und Aufbereitung der entnommenden Proben aus dem Tierversuch

A.5.1. Herstellung der Lösungen für die Laktatmessung:

2,5 mmol Kupfer-II-sulfat- Lösung mit 2-Propanol (95:5) als Geräteeluent

Insgesamt 399,02 mg Kupfer-II-sulfat sowie 50 ml 2-Propanol wurden in einen 1 l Messzylinder gegeben und auf 1 Liter mit *Aqua bidest.* aufgefüllt. Im Anschluß hieran wurde die Lösung mittels Ultraschallbad für 10 min entgast.

Gebrauchslösung: 0,5 mmol Kupfer-II-sulfat- Lösung

Insgesamt 79,80 mg Kupfer-II-sulfat wurden in einen 1 l Messzylinder gegeben und auf 1 Liter mit *Aqua bidest.* aufgefüllt. Auch hier erfolgte eine Entgasung der Lösung im Ultraschallbad für 10 min. Diese Lösung wurde bei der Aufbereitung der Proben verwendet.

Carrez I

Es wurden 17 g Zinkchlorid (zur Analyse) in 100 ml *Aqua bidest.* gelöst.

Carrez II

Es wurden 15 g Kaliumhexacyanoferrat (II) (zur Analyse) in 100 ml *Aqua bidest.* gelöst.

Herstellung Standard

Stammlösung 10mmol/l :

Es wurden 49,9 mg D- + L- Milchsäure eingewogen und in einen 25 ml Messkolben überführt. Der Messkolben wurde mit 0,5 mmol Kupfer-II-sulfat- Lösung aufgefüllt.

1 mmol/l Standardlösung:

Es wurden 100 μl aus der Stammlösung (10 mmol/l) genommen und direkt in ein Vial mit 900 μl Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mmol) verdünnt.

0,1 mmol/l Standardlösung:

Es wurden 100 µl aus dem Vial mit 1 mmol/l entnommen und in ein neues Vial gefüllt. Hierzu wurden 900 µl Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mmol) pipettiert.

A.5.2. Verwendete Primer: Laktobazillen, Enterobakterien und Clostridien

Die verwendeten Primer und ihre genaue Definition sind in Tabelle 28 nachfolgend dargestellt.

Tab. 28: verwendete Primer für die qPCR

Bakteriengruppe	Primernamen	Produktgröße	°C	Primersequenz	Konz.	Nummer der Kopien
Lactobazillen	Lac-1	341bp	58°C	AGCAGTAGGGAATCTTCCA		3,52E+10
	Lac-2			CACCGCTACACATGGAG		
Enterobakterien	EnteropqPCR	454 bp		GTBTCDCRCRCAGRC	0,6µM	3,92E+10
				TGCGYCTGGTRATCTA		
Clostridiencluster I	CI-F1	239	63°C	TACCHRAGGAGGAAGCCAC	0,4 µM	6,83E+10
	CI-R2			GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT		
Clostridiencluster IV	sg-Clept-F	253	60°C	GCACAAGCAGTGGAGT	0,6µM	1,42E+10
	sg-Clept-R			CTTCCTCCGTTTTGTCAA		
Clostridiencluster XIVa	g-Ccoc-F	455	60°C	AAATGACGGTACCTGACTAA	0,4µM	1,33E+10
	g-Ccoc-R			CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA		

A.5.3. Durchführung der DNA-Extraktion

Quelle: institutsinterne Arbeitsanweisung, Stand 2013

Es wurde ein Extraktionsset (QIAamp DNA stool sample extraction Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet, bei dem die zu erhaltene DNA - Menge auf 200 mg frischer bzw. gefrorener Probe bezogen wurde. Zunächst wurde ein Heizblock (SCP Science DigiPREP HAT, S-prep GmbH, Überlingen, Deutschland) auf 90 °C eingestellt und während des Erhitzungsvorgangs jeweils 200 mg Probe in ein steriles Gefäß (Eppendorf Gefäße, RNase frei, 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abgewogen und die Probe erneut auf Eis gelagert. Es wurden 1800 µl ASL Puffer aus dem Extraktionskit hinzugegeben und die Proben für 1 min gut durchmischt (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc. New York, USA). Nach erfolgter Durchmischung wurden die Proben für 10 min bei 90 °C inkubiert und anschließend erneut für 15 Sekunden durchmischt. Der Heizblock wurde auf 70 °C eingestellt, währenddessen die Proben für 1 min bei ~20k g abzentrifugiert wurden. Insgesamt 1,2 ml des Überstands wurden in ein neues Gefäß (Eppendorf Gefäße, RNase frei, 2 ml, Eppendorf AG

Hamburg, Deutschland) überführt und jeweils 1 InhibitEx-Tablette aus dem Extraktionskit hinzugegeben. Die Proben wurden für 1 min durchmischt, worauf eine Minute Inkubation bei Raumtemperatur folgten und im Anschluss die DNA-Extrakte für 3 min bei ~20k g abzentrifugiert wurden. Der gesamten Überstand wurde in ein neues Gefäß (Eppendorf Gefäße, RNase frei, 1,5 ml, Eppendorf AG Hamburg, Deutschland) überführt und erneut zentrifugiert (3 min bei ~20k g). 15 µl Proteinase K wurde in ein neues Gefäß (2 ml Eppie) gegeben und 350 µl des Überstands in das Gefäß mit Proteinase K überführt. Es erfolgte die Zugabe von 350 µl Puffer AL aus dem Extraktionsset und eine Durchmischung für 15 Sekunden mit einer darauffolgenden Inkubation für 10 min bei 70 °C auf dem Heizblock. Es folgte die Zugabe von 350 µl Ethanol (Ethanol reinst (≤99 %), Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland, Karlsruhe) und eine erneute Durchmischung sowie die vorsichtige Überführung von 650 µl Lysat auf die im Extraktionsset enthaltenen Spin-Säulen, die für 1 min bei ~20k g zentrifugiert wurden. Der Rest des Lysats wurde erneut auf die Säulen gegeben und zentrifugiert. Die QIAamp spin Säule wurde in ein neues 2 ml Auffanggefäß gegeben und 500 µl Puffer AW1 auf Säule gegeben und zentrifugiert (1 min bei ~20k g). Die QIAamp spin Säulen wurde in ein neues 2 ml Auffanggefäß gegeben und es wurden 500 µl Puffer AW2 aus dem Extraktionskit hinzugegeben und zentrifugiert (3 min bei ~20k g) (Centrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), in ein neues 2 ml Auffanggefäß überführt und für 1 min bei ~20k g zentrifugiert. Die Abschließende Gewinnung des zu messenden DNA – Extraktes erfolgte durch die Überführung der Säule in ein steriles Gefäß (Eppendorf Gefäße, RNase frei, 1,5 ml, Eppendorf AG Hamburg, Deutschland) mit der Zugabe von 200 µl Puffer AE auf die Säulenmembran, der Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur und der Gewinnung des Extrakts durch zentrifugieren (1min bei ~20k).

A.5.4. Standard Kalbsthymusreihe

Es wurden 1 mg Kalbsthymus-DNA (Kalbsthymus DNA Type XV, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) mit 1 ml TNE-Puffer (10 x TNE, Assay Buffer, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Kalibrierlösungen wurden in zweifacher Konzentration hergestellt, da mit Hoechst Dye 1:2 verdünnt wurde (Tabelle 29).

Tab. 29: Kalibrierreihe Kalbsthymus-DNA von 75 bis 1500 ng/ml

Standard	Volumen TNE 1X	von Lösung mit	Volumen	2x [dsDNA]	dsDNA Konzentration des Standards im Assay
9	450 µl	1 mg/ml	50 µl	100 µg/ml	
8	450 µl	100 µg/ml	50 µl	10 µg/ml	
7	350 µl	10 µg/ml	150 µl	3 µg/ml	1500 ng/ml
6	400 µl	10 µg/ml	100 µl	2 µg/ml	1000 ng/ml
5	250 µl	3 µg/ml	250 µl	1,5 µg/ml	750 ng/ml
4	250 µl	2 µg/ml	250 µl	1 µg/ml	500 ng/ml
3	400 µl	1,5 µg/ml	200 µl	0,5 µg/ml	250 ng/ml
2	300 µl	0,5 µg/ml	200 µl	0,2 µg/ml	100 ng/ml
1	50 µl	0,2 µg/ml	150 µl	0,15 µg/ml	75 ng/ml
Referenz	50 µl				0 ng/ml

A.5.5. Verdünnung Hoechst Dye-Lösung

Hoechst Dye 33258:

Stammlösung (10 mg/ml):

Es wurden 25 mg Hoechst Dye mit 2,5 ml Rnase freiem Wasser gemischt.

Verdünnte Stammlösung (100 µg/ml):

Es wurden 5 µl der Stammlösung mit 495 µl TNE (TNE, Assay Buffer, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gemischt.

Arbeitslösung:

Es wurde 1 µl der verdünnten Stammlösung (100 µg/ml) mit 499 µl TNE gemischt.

A.5.6. TNE Verdünnung für das NanoDrop-Gerät

TNE-Puffer (Stammlösung):

Es wurden 70 ml Rnase freiem Wasser mit 20 ml Tris (1M), 10 ml EDTA (0,2 M) und 70 ml NaCl-Lösung (5M) gemischt. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (0,1M und 1M) auf 7,4 eingestellt.

TNE-Puffer (Arbeitslösung):

Es wurden 5 ml einer der TNE-Stammlösung mit 45 ml Rnase freiem Wasser gemischt und mit einem 0,2 µm Cellulose-Acetat-Filter steril filtriert.

A.5.7. Vorbereitung des Mastermixgemisches inkl. der spezifischen Primer

Berechnung des Gesamtvolumens:

1 Ansatz = 25 μ l

10 Ansätze = 2500 μ l

1. Anteil Mastermix low Rox: Gesamtvolumen/2 = 1250 μ l
2. Anteil Primer 1: Gesamtvolumen: 50 = 0,2 μ M = 100 μ l
3. Anteil Primer 2: Gesamtvolumen: 50 = 0,2 μ M = 100 μ l
4. Anteil RNase freies Wasser: Gesamtvolumen – Summe aller Komponenten (1.,2.,3.) = 1050 μ l

A.5.8. qPCR Messungszykluseinstellungen

Für die Messung der Kopienanzahl der gewählten Bakteriengruppen wurden die Reaktionsbedingungen für die Geräteeinstellung nachfolgend dargestellt (Tabelle 29).

Tab. 30: Reaktionsbedingungen und qPCR-Parameter

Vorgang	Dauer und Temperatur
Aktivierung	95 °C für 10 min
Amplifizierungszyklus	40 x
Denaturierung	30sec bei 95°C
Binden der Primermoleküle	60 sec bei 58°C
Elongation der DNA-Fragmente	60 sec bei 72°C
Schmelzkurvenanalytik	+

Danksagung

Für die Vergabe, Betreuung und finanzielle Förderung der Dissertation über Stipendien bedanke ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Zentek. Sein stets entgegen gebrachtes Vertrauen in meine Dissertation hat mich stets motiviert dabei zu bleiben und niemals aufzugeben. Die Chance mich in das Gebiet der Tierernährung auch bei anderen Tierarten einzuarbeiten und auch eine Vorlesungsstunde zu halten ermöglichte mir beruflich den weiteren Werdegang, wofür ich ihm hier noch einmal explizit danken möchte!

Dem Projektträger Innovationsförderung der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung möchte ich meinen Dank für die Förderung des Verbundprojekts: „Entwicklung innovativer pflanzlicher Futtermittelzusatzstoffe zur Verbesserung der Tiergesundheit und Effizienzsteigerung in der Produktion tierischer Lebensmittel“ aussprechen. Den beteiligten Projektpartnern Lisa Brucker, Dipl.-LM-Ing. Christian Geerkens als auch Prof. Dr. Reinhold Carle, Leiter des Fachgebiets Technologie und Analytik pflanzlicher Lebensmittel der Universität Hohenheim, möchte ich besonders für die gute Zusammenarbeit in diesem gemeinsamen Projekt danken. Für die zuverlässige Zusammenarbeit und Bereitstellen sowie aufbereiten des Apfelpektins und der depektinisierten Mangoschalen möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Hans-Ulrich Endreß und Dr. Hans-Joachim Schawaller von Herbstreith & Fox KG. bedanken. Insbesondere Dr. Schawaller hat in kürzester Zeit Unmengen an Mangoschalen in einem eigens hierfür entwickelten Verfahren depektinisiert und sie immer sofort in sinnvollen Portionen zur weiteren Lyophilisierung ins Institut für Tierernährung bringen lassen. Hierdurch war es möglich während der weiteren Depektinisierung der restlichen Schalen die bereits bearbeiteten Schalen schonend zu trocknen und pünktlich zum geplanten Tierversuchsbeginn fertige Futtermischungen herzustellen.

Für die Unterstützung bei der Beschaffung der Tiere sowie der Betreuung im Stall möchte ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Klaus Männer bedanken. Er war stets ein ausgezeichneter Ansprechpartner, wenn es um die Einschätzung des Verhaltens der Tiere ging.

Ich möchte mich ganz besonders bei Wilfried Vahjen für die Unterstützung während meiner Laborarbeiten zu theoretischen Fragestellungen bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor möchte ich Luisa Ebersbach, Katharina Topp und Anett Kriesten danken. Luisa Ebersbach möchte ich für die über das übliche Maß hinausgehende Unterstützung an dem Abend vor einem wichtigen Vorstellungsgespräch

danken, als die Proben drohten mich bis zum nächsten Tag einzunehmen aufgrund eines nicht bekannten Fehlers und sie den Abend zur Vorbereitung gerettet hat.

Für die Einführung in die Welt der Statistik, die zahllosen Gespräche und die wissenschaftlichen Diskussionen möchte ich mich bei Dr. Annelise Mader, Dr. Isabelle Ruhnke und Bernd Lieschke bedanken.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei meinen netten Kollegen bedanken. Die Unterstützung an den langen Probenentnahmetagen war stets von großer Ausdauer, Selbstständigkeit und guter Stimmung begleitet. Unter den hilfsbereiten Kollegen im Institut danke ich besonders Dr. Nadine Passlack, Dr. Isabelle Ruhnke und Dr. Fanny Knorr, Dr. Heike Vodde, PhD Lena Martins, PhD Abdul Hafeez und Dr. Anette Walpuski, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und mir immer mit Rat und Tat freundschaftlich zur Seite standen.

Für die Hilfe bei den wöchentlichen Wiegen sowie beim regelmäßigen Futter nachwiegen und nach dem Rechten schauen als auch bei der Unterstützung zu Versuchsende bei der Probenentnahme und die netten Gespräche über die Jahre möchte ich mich ganz besonders bei Corinna Schmidt, Christian Schulze, Ines Bebert und Sandra Fischer bedanken.

Meinem Ehemann, Frederik Lau, möchte ich für die moralische Unterstützung und Geduld während der Doktorarbeit danken. Er hielt mir stets den Rücken frei und war mein Anker, mein Held und hat sich nie beklagt bei der Bearbeitung während des Urlaubs oder der Wochenenden. Auch möchte ich mich hier gerne bei meinem Sohn Hendrik Lau bedanken, der mir bei der Vorbereitung zur Disputation ein steter Antrieb war und mir überhaupt die Möglichkeit gab mich vorzubereiten.

Dr. Susanne Kerstan, Sabine Reichardt, Dr. Ingo Schmidt, Julia Görs und Yasmin Ramirez möchte ich für die fachlichen Diskussionen und die entgegengebrachte tief gehende Freundschaft durch dick und dünn in dieser Zeit danken. Ihr seid schon so lange an meiner Seite, dass ihr zur Familie gehört und wir zusammen immer alles bewältigen werden.

Dr. Kurt Haskic danke ich besonders für die Inspiration, das Vorbild und den Traum von einer Promotion, lange bevor das hier alles angefangen hat. Dr. Tobias Ripp danke ich für die Einführung in das Literaturverwaltungsprogramm sowie die kompetente Beantwortung bei Fragestellungen zur Formatierung.

Zu guter Letzt danke ich meiner Großmutter Rosemarie Ludwig für die finanzielle Unterstützung während des Stipendiums, ohne die es sehr schwierig geworden wäre. Ihre weise Voraussicht und Planung verhalf bereits der zweiten Generation zum begehrten Titel.

Finanzierungsquellen

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt durch den Projektträger Innovationsförderung der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung durch das Verbundprojekt: „Entwicklung innovativer pflanzlicher Futtermittelzusatzstoffe zur Verbesserung der Tiergesundheit und Effizienzsteigerung in der Produktion tierischer Lebensmittel“.

Interessenskonflikte – Conflict of Interest

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 28.02.2018

Erin Lau